UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DES SCIENCES
Institut de biologie et de physiologie végétales
Directeur : Professeur P.-E. Pilet

Croissance des cellules végétales et synthèse du RNA

Thèse

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences
par

JEAN-LOUIS LEUBA

1976

Grafipress R. Fawer S. A., Renens
1977

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DES SCIENCES
Institut de biologie et de physiologie végétales
Directeur : Professeur P.-E. Pilet

Croissance des cellules végétales et synthèse du RNA

Thèse

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences
par

JEAN-LOUIS LEUBA

Grafipress R. Fawer S. A., Renens
1977

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM Prof. Paul-Emile Pilet, directeur de thèse, Dr. Dominique Reymond, expert, Prof. André Delessert, président du jury,

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

M. Jean-Louis Leuba, licencié ès sciences (diplôme d'Université), type II de l'Université de Lausanne,

intitulée

"Croissance des cellules végétales et synthèse du RNA"

Lausanne, le 19 juillet 1976

Le doyen de la Faculté des Sciences:
André Delessert

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT-PROPOS

Monsieur le Professeur P.E. PILET a bien voulu diriger ces recherches. Je le prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour les nombreux et fructueux entretiens qu'il m'a accordés et ses conseils judicieux et éclairés.

La possibilité de travailler dans des conditions d'indépendance aussi larges que possible et l'enthou - siasme scientifique communicatif de Monsieur le Profes - seur PILET ont été, pour moi, des facteurs certains de stimulation.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Dr. Dominique REYMOND, de la Société d'assistance technique pour produits NESTLE S.A., qui a bien voulu accepter d'être membre du jury d'examen.

Enfin, je tiens à exprimer ma sincère amitié à mes collègues qui m'ont toujours aimablement aidé, et ma gratitude au personnel technique pour son dévouement.

TABLEAU DES ABREVIATIONS

Act. D	Actinomycine D
AIA	Acide indole-3-acétique
AIA-OX	Auxines-oxydases
AMP (ADP;ATP)	Adénosine monophosphate (di;triphosphates)
AO	Acridine orange
APC	Acide perchlorique
AS	Acido-soluble
ATC	Acide trichloracétique
Ci	Curie
CMP	Cytosine monophosphate
Cpm; dpm	Coups par minute; désintégration par min.
2,4 D	Acide 2,4 dichlorophénoxy acétique
DNA	Acide désoxyribonucléique
D.O.	Densité optique ou absorbance
GMP	Guanosine monophosphate
Bis MSB	p-bis (o.méthyl styryl) benzène
PEI	Poly éthylèneimine
Pf	Proflavine
PF	Poids frais (ou humide)
POPOP	1,4 bis (2,5 phényl oxazolyl) benzène
PPO	2,5 diphényl oxazole
PS	Poids sec
RNA	Acide ribonucléique
m-RNA	RNA méssager
r-RNA	RNA ribosomal
s-RNA (t-RNA)	RNA soluble (RNA de transfert)
RNase	Ribonucléase
S	Segment ou section
ST	Solution de traitement
TE	Témoin
TR	Traité
UMP	Uridine monophosphate

I N T R O D U C T I O N

Les Phytohormones (composés auxiniques, gibbérélllines, cytokinines et acide abscissique) sont des régulateurs intercellulaires connus par la multiplicité de leurs effets sur les végétaux. Les plus anciennement connues et étudiées sont les dérivés indoliques naturels (auxines) Les auxines sont transportées de leur site de synthèse et distribuées dans les divers tissus. Elles peuvent influencer différents processus (rhizogénèse, dominance apicale, divisions cellulaires de cultures de tissus, géo - tropisme, phototropisme, parthénocarpie, chute des feuilles etc.), mais leur effet principal s'exerce sur la croissance cellulaire, et plus particulièrement sur l'allongement.

Si les effets provoqués par les auxines sont évidents, leur mode d'action l'est beaucoup moins. Cependant l'élucidation ou la découverte de certains mécanismes réactionnels, s'ils n'expliquent pas tout, nous permettent d'avoir des conceptions de plus en plus précises sur le ou les processus "primaires" modifiés par les auxines. Une des hypothèses les plus suivies ces dernières années envisage une intervention de ces modulateurs de croissance au niveau du génome, soit au niveau de la transcription (synthèse du RNA méssager à partir du DNA matriciel), soit au niveau de la traduction (synthèse codée des protéines).

Dans cette optique, nous avons étudié les rapports divers qui pourraient exister, dans les cellules de tige de Pois, entre la croissance, sous le contrôle des auxines endogènes, et le métabolisme de l'acide ribonucléique.

CHAPITRE I

QUELQUES ASPECTS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

1. Généralités

La croissance d'un organisme est un processus biologique complexe. Il se traduit par l'augmentation irréversible du volume, alliée, le plus souvent, à un accroissement de la masse. Au niveau cellulaire, la croissance est assurée par deux mécanismes fondamentaux: le mérésis (division), contrôlant la multiplication cellulaire, et l'axésis (expansion), qui correspond à une augmentation du volume cellulaire.

Nous n'aborderons pas le problème des divisions, mais nous préciserons quelques aspects du grandissement cellulaire. L'expansion peut être dirigée; elle est tangeantielle, iso - diamétrique ou réalisée selon un axe privilégié; dans ce dernier cas, on parlera d'élongation.

2. Structure de la paroi

On ne peut pas aborder les mécanismes de l'élongation

sans aborder la structure de la paroi squelettique qui borde la cellule végétale. La lamelle moyenne et la membrane primaire (ou paroi I) sont seules concernées par l'élongation. Les feuillets élaborés après la croissance appartiennent à la membrane secondaire ou paroi II).
La structure de la paroi cellulaire a été particulièrement bien étudiée et décrite entre autres par ROELOFSEN (1965), LAMPORT (1965), NORTHCOTE (1969 et 1972) et PILET (1971).

La paroi I est constituée d'un réseau de microfibrilles cellulosiques plongées dans une matrice amorphe, complexe et hydratée. La phase dispersée (microfibrilles) confère une certaine rigidité à l'édifice (comme dans du verre armé) et permet à la paroi de s'opposer aux forces de turgescence.
La paroi se modifie au cours de la croissance, mais sa structure de base est maintenue, quoique remaniée. L'orientation des microfibrilles change: d'abord plus ou moins perpendiculaire à l'axe d'élongation, l'orientation se fait ensuite paralléle-ment à cet axe. Lors d'une élongation intensive, la paroi relâche sa structure, son extensibilité augmente. Les micro-fibrilles peuvent glisser les unes sur les autres et se séparer. Sous l'effet de la pression de turgescence, la paroi s'étire. Après équilibre des forces, la paroi doit être consolidée pour maintenir l'extension acquise. De nouveaux réseaux de fibrilles se déposent depuis le plasmalemme vers l'ancien réseau distendu; on parle alors de "multi-net growth" (type d'apposition particulier). On voit donc que la paroi est une structure dynamique, vivante, dont les propriétés et la composition, sans cesse modifiée, répondent constamment aux obligations imposées par certains processus (croissance et différenciation). La densité des fibrilles, la géométrie de la structure ainsi que les interactions entre ces fibrilles et la matrice, au point de contact, jouent un rôle essentiel. Les modifications

de ces interactions assurant la cohésion de l'édifice se traduisent par une altération des caractéristiques de la transmission des forces exercées. Quant aux composés inter - médiaires (en faible quantité), ils modulent les propriétés de l'ensemble. Enfin, l'eau, en tant que constituant fondamental de la matrice occupe une place non négligeable.

2.1 Microfibrilles de cellulose

Les microfibrilles sont formées de longues chaînes non ramifiées de glucopyranoses, avec liaison $\beta(1,4)$. Leur struc - ture est hélicoïdale, le long de l'axe de la microfibrille. On distingue des régions organisées (cristallines) séparées par des régions désordonnées (paracristallines). Le cristal unitaire a pour base 5 unités de cellobiose; sa structure particulière permet la formation de chaînes antiparallèles. Des liaisons hydrogène (internes ou externes) renforcent la cohésion de l'édifice.

2.2 La matrice

La matrice est constituée d'un enchevêtrement de sub - stances polymérisées fortement hydratées (polysaccharides et polyuronides), mélées à des protéines (glucoprotéines). Les polysaccharides à orientation linéaire sont présents à tous les stades du développement de la paroi; d'autres, fortement branchés, ne se déposent qu'à des périodes particulières de la croissance. On distingue:

- Les hémicelluloses

Les hémicelluloses (certains auteurs préfèrent parler d'holocellulose (PILET, 1971) qu'on peut séparer en hémi- cellulose (I et II), xylanes, glucomannanes, solubles dans les alcali concentrés. Pour NORTHCOTE(1972), les hémicellu loses sont formées de chaînes linéaires d'homopolymères (mannanes, galactanes, xylanes et arabanes) pouvant porter d'autres monomères en courtes chaînes latérales ou dans la chaîne latérale (on a alors un hétéropolymère comme le gluco- mannane, le galactomannane etc.). L'acide glucuronique ou ses esters méthylés peuvent se fixer en position latérale.

Les xylanes: les chaînes de xylane ne sont pas stabilisées par des ponts hydrogène , mais par l'inclusion de molécules d'eau dans la structure cristalline. A l'intérieur de la matrice, les molécules de xylane sont orientées dans la même direction que les microfibrilles cellulosiques, entre celles-ci, en arrangement para-cristallin; certaines sont adsorbées à la surface même de ces fibrilles, par des liaisons du type van der Waals ou hydrogène. Ce processus est lié à la présence de l'eau, le degré d'hydratation dépendant lui-même du taux en acide uronique et en arabinose.

Glucomannanes et galactomannanes: leur conformation spaciale est semblable à celle de la cellulose, avec arrangement para-cristallin entre les microfibrilles.

- Les pectines

Les pectines sont aussi un mélange complexe de polysaccharides. On les sépare en composés acides (galacturonorhamnanes) ou neutres (arabino-galactanes)

Une des propriétés remarquables des pectines est de former des gels réversibles et des solutions visqueuses; ainsi, les pectines influencent la redistribution de l'eau à l'intérieur de la paroi, et de ce fait, contrôlent les relations qui existent entre les différents polysaccharides à l'intérieur de la matrice, et les relations entre cette matrice et les microfibrilles. La méthylation des groupes carboxyliques ou l'acétylation des hydroxyles modifient les propriétés de la pectine. La nature ionique des acides présents permet la fixation de cations bivalents (Ca^{2+}) pour donner des pectates qui réduisent la plasticité de la paroi.

2.3 Protéines associées à la paroi

Des glycoprotéines ont été isolées de fractions de parois. Elles contiennent des résidus hydroxy-prolines liées à des oligosaccharides contenant du galactose et de l'arabinose. Ces courtes chaînes (8 unites de sucre) ne semblent pas impliquées dans la formation de ponts covalents entre les longs polymères de la paroi. Ces glycoprotéines sont étroitement associées à la fraction α-cellulosique. Pour NORTHCOTE (1972), elles pourraient intervenir dans la liaison entre matrice et microfibrilles.

2.4 Modèle de paroi

KEEGSTRA et al. (1973) ont présenté un modèle original de la paroi primaire de cellules de Sycamore, basé sur les résultats obtenus par chromatographie en phase gaseuse, la spectrométrie de masse et l'utilisation d'enzymes hydrolytiques spécifiques.

Dans ce modèle, les fibrilles élémentaires de cellulose sont connectées à la matrice par des liaisons hydrogène, et par l'intermédiaire de xyloglucanes. Ces-derniers sont à leur tour liés à une protéine structurale, probablement par des chaînes arabinogalactanes, au niveau d'un résidu séryl de cette protéine. Il semble, d'après ces auteurs, que la seule liaison non covalente soit celle qui unit la cellulose aux xyloglucanes. C'est la liaison hydrogène, mentionnée plus haut; elle est labile (notamment en présence de protons) et pourrait, en se scindant, permettre la libération des fibrilles de cellulose. Ces-dernières pourraient alors facilement glisser les unes sur les autres lors du processus de l'élongation de la paroi.

3. Mécanismes de l'élongation cellulaire

3.1 Facteurs impliqués

Pour que l'élongation puisse se réaliser, certaines conditions précises doivent être remplies. Elles ressortent des nombreux travaux consacrés à ce problème (MORRÉ et EISENGER, 1968; CLELAND, 1968 et 1971); PILET, 1971 et 1974) Les différents points importants sont les suivants:

1° La structure de la paroi doit être assouplie par un relâchement de la structure (ce qui se traduit par une augmentation de l'extensibilité ou de la déformabilité).

2° L'élongation n'est réalisée que si la turgescence de la cellule est importante et que de l'eau puisse être absorbée. C'est la pression de turgescence (Pression osmotique interne) qui transforme l'extensibilité en extension (ce n'est d'ailleurs pas le seul facteur).

3° Le processus est actif. Il requiert de l'énergie (respiration ou facteurs énergétiques), du moins dans la phase de relâchement.

4° La synthèse du RNA, des protéines ou d'autres facteurs, inconnus mais synthétisés par les cellules vivantes, sont indispensables pour une croissance continue à long terme

5° Le taux d'expansion cellulaire est contrôlé par les AUXINES, du moins dans la plupart des tissus de plantes supérieures. Ces auxines, dont la plus connue est l'acide indole-3-acétique ou AIA (substance naturelle) agissent en augmentant l'exten - sibilité de la paroi (et le relâchement de la structure).

6° Un pH acide (ou le CO_2) provoquent une extension très rapide (visible des les premières minutes) comparable à celle provoquée par l'auxine, mais de courte durée (1 à 2 heures). Cet effet du pH n'est pas limité par la synthèse des pro - téines, contrairement à celui induit par l'auxine.

7° Une augmentation d'extensibilité (par exemple, sous l'effet de l'AIA) n'entraîne pas forcément l'extension cellulaire. Ainsi, certains découplants osmotiques (mannitol) stoppent l'élongation, même en présence d'AIA; par contre, l'exten - sibilité est fortement augmentée. L'actinomycine D (inhibiteur de la synthèse du RNA) en présence d'AIA inhibe l'élongation alors que la stimulation d'extensibilité provoquée par l'auxine et les conditions de turgescence permettraient une croissance rapide.

Ces considérations montrent que le problème reste complexe. La croissance n'est pas un phénomène du "tout ou rien", mais elle est réglée qualitativement et quantitativement par plusieurs facteurs qui interagissent les uns sur les autres.

3.2 Auxines et RNA

Les auxines, comme d'autres phytohormones, sont impliquées dans la croissance et plus spécialement l'auxésis (PILET, 1961). Elles participent activement au processus de l'extension et provoquent l'assouplissement de la paroi. Elles interviennent au niveau de la transcription en stimulant la synthèse des acides nucléiques et surtout l'acide ribonucléique (RNA). L'article de KEY (1969), avec près de deux cents références,

est une bonne mise au point concernant l'action des auxines (et d'autres phytohormones) au niveau du RNA. Certaines des théories récentes avancées pour expliquer le possible mode d'action primaire des auxines (sur la base des données de la biologie moléculaire) ont été résumées par LESHEM (1973). Elles seront traitées dans les chapitres V et VI. Parmi les hypothèses les plus intéressantes on peut citer:

- l'effet régulateur des auxines sur la transcription: deux possibilités sont à envisager; l'auxine se lie à un récepteur protéinique (associé ou non au plasmalemme). Le complexe formé ou la protéine seule mais activée stimule la transcription (modification de l'activité des RNA-polymérases). Dans la seconde possibilité, la liaison de l'auxine en un site spéci - fique du plasmalemme provoque l'expulsion d'un facteur susceptible de stimuler la transcription.
- rôle de dérépresseur génétique: certains auteurs suggèrent que l'auxine induit la production d'un DNA spécifique capable de coder des m-RNA particuliers biologiquement actifs. Une autre interprétation un peu différente attribue à l'AIA un rôle de dérépresseur génétique du complexe DNA-histone, soit en empêchant l'association du répresseur (histone) au DNA, soit en séparant partiellement ces deux molécules, ou encore en ouvrant localement le duplex et en séparant partiellement les deux brins de DNA (étape indispensable pour l'activité des RNA-polymérases). On a aussi envisagé des possibilités de régulation en attribuant aux auxines des propriétés d'effecteur allostérique, ou en faisant intervenir un second messager (cAMP) et une adényl-cyclase intermédiaire. Le cAMP (3'5'AMP cyclique) pourrait, à son tour, activer une ou plusieurs protéines (précurseurs, enzymes ou "CAP-proteins"*). Enfin, l'intervention directe des auxines au niveau du RNA et la formation d'un complexe spécifique (AIA-RNA, par exemple) semble maintenant peu probable.

*catabolite gene activating proteins

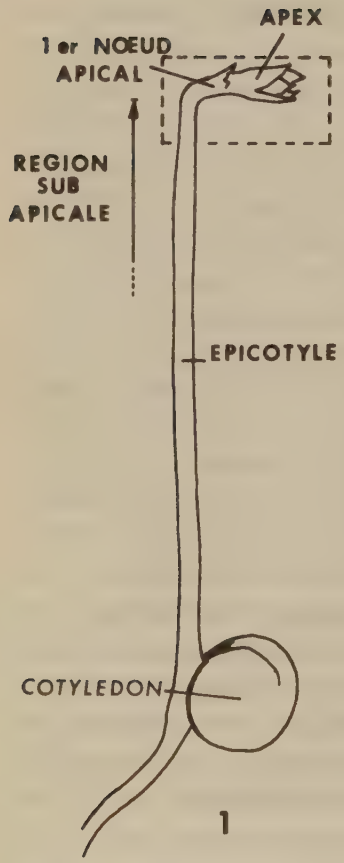
CHAPITRE II

MATERIEL BIOLOGIQUE, METHODES ET CRITERES DE CROISSANCE

1. Choix du matériel végétal

Toutes les expériences réalisées ont été effectuées sur des tiges (épicotyles) de Pois (Pisum sativum var."Alaska express", de la maison Vilmorin-Andrieux-France). Sur ces épicotyles (fig. 1), seule la zone subapicale a été étudiée; topographiquement, cette région de l'axe comprend les 20 premiers mm situés en dessous de l'ébauche du nœud apical et correspond à des tissus en phase d'élongation sans divisions. (fig. 2).

L'utilisation de cette légumineuse a été motivée par les avantages qu'offre ce type de plante pour les expérimentations envisagées; en effet, cette variété de Pois présente une plantule dont l'épicotyle est parfaitement rectiligne, ce qui permet de mesurer les variations d'élongation sans trop de difficulté; de plus, les tissus sont suffisamment rigides et turgescents pour qu'on puisse prélever, par excision, des segments de tige.
Dans tous les cas les plantes sont étiolées (c'est-à-dire cultivées à l'obscurité).
Le Pois est un matériel relativement bien connu, tant du point



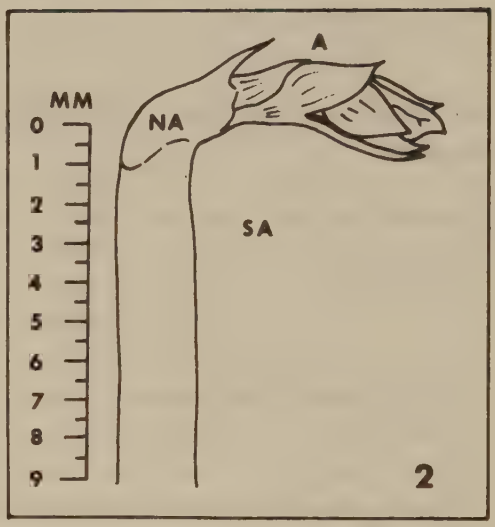


Fig. 1

EPICOTYLE DE POIS

Fig. 2

APEX ET REGION SUBAPICALE

de vue anatomique que physiologique, utilisé principalement dans les études de croissance ou de différenciation cellulaire, dans les problèmes de phytohormonologie, soit généraux, soit plus particuliers comme la dominance apicale ou les phyto - chromes. Enfin, la germination, la culture et la conservation des plantules ne posent aucun problème particulier.

2. Mise en culture

2.1 Imbibition

Les graines de Pois sont lavées abondamment à l'eau courante pendant 15 min pour éliminer les produits chimiques antifongiques couvrant les téguments puis plongées pendant exactement 8 min dans de l'eau déionisée maintenue à $60^{\circ} \pm 0,2^{\circ}C$. Après les avoir laissées refroidir 1 heure à l'obscurité, on les traite par une solution de chlorure mercurique à 1 p. 1 000 (temps de contact: 1 min) ce qui assure une stéri - lisation suffisante. On les rince soigneusement à l'eau bidis - tillée pour éliminer toute trace de chlorure qui pourrait diminuer la germination ou la croissance. Dans tous les cas, l'eau destinée aux lavages doit être tempérée à environ $20^{\circ}C$ car un refroidissement trop brusque des graines provoque une inhibition plus ou moins marquée de la germination.

2.2 Germination

Les graines ainsi imbibées sont déposées sur un support minéral chimiquement inerte appelé communément "terralite" qui a été préalablement humidifié. On mélange intimément deux béchers de terralite (1 200 ml) et 700 ml d'eau déioni - sée. Le mélange saturé en eau est déposé dans un bac de

12 cm de profondeur. On élimine éventuellement l'eau non absorbée puis on enfonce délicatement les graines dans la terralite de façon à ce qu'elles affleurent la surface; on les oriente pour que la radicule, facilement discernable sous le tégument après imbibition, soit dirigée contre le bas; sous l'effet du géotropisme la racine sera immédiatement dans sa position définitive et trouvera de suite l'eau indispensable à la croissance des plantules. Les bac ainsi préparés sont couverts (par des couvercles adaptables qui assurent une bonne conservation de l'humidité et contribuent à augmenter la pression partielle de CO_2 , ces deux facteurs favorisant la croissance) puis placés dans une étuve thermo - statée à 24°C, à l'obscurité. Pendant toute la durée de la culture on évite que le support minéral ne se déshydrate en rajoutant un peu d'eau bidistillée.

La terralite ou vermiculite est un bon substrat pour la culture en bac car elle absorbe fortement l'eau tout en restant bien aérée. Elle se compose d'hydromicas ou de minéraux apparentés à la montmorillonite (phyllosilicates) dont la formule est la suivante: $\left[Si_4O_{10}\ (OH)_2\right]Al_2,\ 4H_2O$; Al peut se substituer progressivement à Si dans les couches tétraédriques et Mg, Fe^{+2} ou Fe^{+3} à Al dans les couches octoédriques . Des molécules d'eau peuvent s'insérer entre les feuillets ce qui explique qu'une des caractéristiques principales de ce minéral est de 'gonfler' lorsqu'il est mis en présence d'eau. Deshydraté par chauffage, il se sépare en feuillets ou phyllites dont l'épaisseur varie de 10,5 Å (forme anhydre) à 19 Å (forme hydratée à 50 %). La variété de terralite utilisée (Gartenman & Cie, Zollikofen) subit un second chauffage à haute température pour la rendre chimiquement inerte; sa préparation est destinée, en premier lieu, à l'agronomie.

Les cultures n'ont été que très rarement infectées par des moisissures. L'infection fongique, quand elle se produit, est localisée autour des graines non germées après la période de latence habituelle. Il suffit de les éliminer rapidement pour éviter la propagation du mycélium.

2.3 Sélection

Après 112 heures de culture, les plantules sont bien formées. Leur épicotyle a une longueur moyenne de 5,7±0,5 cm. Ils sont tous très droits, et environ 67,1 % d'entre-eux présentent l'ébauche du premier nœud apical au niveau de la courbure caractéristique de l'apex. On sélectionne soigneusement toutes les plantules dont les dimensions et l'état de dévelop - pement correspond à celui que nous venons de décrire.

Au cours de la sélection, il faut éviter absolument que les plantules ne se déssèchent (en effet, la deshydratation provoque une diminution de la turgescence des tissus, ce qui conduit à la flétrissure); pour celà, on les dispose verticalement contre un support, les racines baignant dans une solution physiologique (solution de RINGER: 6 g NaCl; 0,075 g KCl; 0,1 g $CaCl_2$ et 0,1 g $NaHCO_3$ pour 1 litre d'eau déionisée.

Lumière verte

Il est bien connu que la lumière blanche induit ou modifie certains des processus physiologiques et biochimiques chez les végétaux. Ses effets s'exercent surtout par l'intermédiaire de recepteurs photochimiques; certains d'entre eux sont reconnus (pigments caroténoïques, chlorophylliens et phytochromes), mais d'autres restent à identifier, bien qu'ayant une existence probable. Les effets produits par l'action de la lumière dépendent non seulement de la quantité fournie (énergie), mais aussi de la qualité spectrale; seules certaines longueurs d'onde

ont une action marquée; elles se situent principalement dans le bleu (400 à 470 nm), dans le rouge (650 nm environ) et dans le rouge lointain ou far red (720 nm). Les systèmes physiologiques modifiés par ces longueurs d'onde sont nombreux et diversifiés; parmi les plus importants on peut citer: la photosynthèse, la pigmentation, la morphologie des plantules, la croissance, la dormance, le phototropisme, le photopériodisme etc. D'autre part, certains régulateurs de la croissance peuvent être directement ou indirectement impliqués dans les diverses réponses de la plante soumise à des stimuli lumineux. Ainsi, la lumière perturbe l'équilibre existant entre les différentes phytohormones contrôlant la croissance, provoque une redistribution des composés auxiniques ou, dans certains cas, leur innactivation (PILET, 1961), modifie l'activité de systèmes enzymatiques impliqués dans la régulation (comme les auxine-oxydases-GALSTON et BAKER, 1953). BRIAN (1958) montre que la lumière induit une synthèse accrue de "gibberrelin-like-substances"alors que les kinétines augmentent son efficacité (FRIES, 1960).

Sur les plantules de Pois étiolées, la lumière blanche provoque la disparition de la courbure terminale et un redres - sement de l'apex (cette courbure de la partie terminale de la tige étiolée permet ou facilite la pénétration dans le sol sans dommage pour le méristème apical); on note aussi un retard de croissance de la zone épicotylaire par rapport à la plantule étiolée, mais un développement des feuilles (PARKER et al.,1949), un verdissement des tissus par transformation de la protochloro - phylle en chlorophylle (KLEIN et al., 1957) et une accumulation de composés anthocyaniques.

Pour éviter d'introduire des paramètres supplémentaires ou non contrôlés, toutes les expériences ont été menées à l'obscu - rité ou sous lumière verte qui n'a pratiquement pas d'effet sur les processus physiologiques discutés plus haut. On utilise

comme source lumineuse un tube fluorescent, du type OSRAM L 40 W (Hellgrün) entouré de quatre couches de cellophane vert. La bande d'émission est comprise entre 510 et 540 nm.

3. Méthodes et techniques générales

3.1 Délimitation de segments sur la zone d'élongation

Pour étudier l'évolution de l'élongation le long de la région subapicale, on délimite arbitrairement sur l'axe des inter - valles ou segments(leur longueur est généralement de 5 mm). Au cours de la croissance, les limites de ces segments, repérées par une marque visible, vont se déplacer pour définir un nouvel intervalle. La différence de longeur entre le segment initial et le segment final représente l'élongation du segment considéré. Pratiquement, on dispose d'un accessoire très simple permettant de marquer plusieurs segments à la fois. Il est constitué de deux réglettes métalliques, graduées fixée en paralléle sur un support rigide; entre les deux, on laisse un espace libre (8 mm), juste supérieur au diamètre des épicotyles. Des fils très minces sont tendus entre les réglettes, définissant les intervalles choisis. On imprégne ces fils d'un mélange d'encre de Chine et de quelques gouttes de glycérine, puis on les applique délicatement sur la partie de l'épicotyle concernée, en maintenant les réglettes parallèles à l'axe de la tige. Les traces laissées adhèrent bien à la surface épidermique (pour autant qu'elle soit sèche); leur épaisseur ne dépasse pas 0,02 mm.
Après le marquage, les plantules sont remises en culture sur vermiculite, dans les mêmes conditions que celles qui ont été décrites(voir 2.). Après la croissance (22 hr de culture), les segments sont mesurés, excisés à l'aide d'une lame de rasoir de façon à pouvoir déterminer certains paramètres physiologiques (poids frais, poids sec et teneur en eau) ou biochimiques

(RNA, protéines ou autres constituants).

3.2 Segments excisés ou "sections"

Pour certaines expériences "in vivo", des segments déterminés sont prélevés par excision, puis conservés un minimum de temps dans un milieu de survie. On incorpore à ce milieu (tampon saccharosé) les substances actives (composés auxiniques, précurseurs radioactifs, antibiotiques etc) étudiées. Après l'incubation (dans des conditions définies et contrôlées), on mesure sur ces sections les effets produits.

Pour l'excision, on dispose d'un emporte-pièce portant des lames de rasoir disposées en parallèle. Les distances séparant ces lames sont réglables (2, 3 et 5 mm); On peut donc, en une seule fois, exciser sur un épicotyle plusieus segments dont la longueur et la distance au point limite supérieur de la zone étudiée ont été préalablement choisies.

Précision de la longueur des sections:
longueur théorique: 3 mm (distance entre les lames); longueur réelle de la section de tige: 3,025 mm.
longueur théorique: 5 mm; longeur réelle: 5,040 et 4,980 mm

3.3 Mesure des longueurs

a/ segments sur l'épicotyle: on mesure la longueur des segments sous une loupe binoculaire (grossissement 10 ou 30) sur laquelle est incorporée une échelle micrométrique. La précision est d'environ 2/100 de mm.

b/ sections: pour les études cinétiques de l'élongation, la longueur doit être mesurée à des temps proches (1 à 1,5 hr); Il est donc impossible de mesurer un grand nombre de sections par la méthode précédente, d'autant plus que ces sections doivent, après la mesure, être remises dans le milieu de façon à ce que le traitement puisse continuer. Dans ce cas, on procède comme suit: les sections, au moment de la mesure

sont rapidement placées sur un papier-filtre imbibé par la solution contenant ces sections; on dépose encore une réglette millimétrique semi-translucide (étalon). Le tout est placé sur un fond de boîte de Pétri en verre (diamètre 11 cm), elle-même posée au-dessus d'une source lumineuse verte (535 nm) ajustée au diamètre de la boîte. On photographie les sections (8 secondes) puis on les replace dans un milieu neuf identique. L'opération ne prend en tout que quelques minutes. Des tests préliminaires comparatifs ont montré que ces manutentions n'altèrent en rien la croissance des tissus. Les négatifs photographiques obtenus sont examinés sous la loupe binoculaire (x 30); les longueurs obtenues - divisions micrométriques de l'oculaire transformées en mm par l'intermédiaire de l'étalon - sont absolument identiques à celles qui sont directement mesurées sur le matériel.

3.4 Poids frais (PF) et poids sec (PS)

Poids frais et sec sont des critères usuels de la croissance des tissus végétaux. En fait, ils ne sont pas toujours strictement liés à ce processus et peuvent être influencés par d'autres facteurs. Le poids frais tient compte de la teneur en eau des tissus; celle-ci, par exemple dans le cas de l'élongation, est en étroite relation avec la croissance. Par contre, si les mouvements d'eau ne varient pas dans le même sens, le rapport devient moins évident.

Détermination du PF: les segments excisés sont recueillis dans une solution de Ringer à 0-2°C. On les sèche ensuite sur deux disques de papier-filtre (dans un Pétri); on les agite rapidement jusqu' à ce qu'ils se détachent du papier. On les introduit dans un tube taré, hermétique (environ 20 segments par tube). Le PF est donné par pesée.

Le poids sec évolue en fonction de la fraction paroi et des réserves (éventuellement avec les protéines); c'est un complément

utile du poids frais et nécessaire pour déderminer la teneur en eau.

Détermination du PS: les segments sont déposés dans un tube taré et séchés dans une étuve à 70°C jusqu'à poids constant. Dans certains cas, ces segments sont lyophilisés après congéla - tion à -45°C, et leur poids déterminé.

4. Expression des résultats

4.1 Elongation

Considérons un segment d'épicotyle; sa longueur initiale, au temps t_o, est désignée par L_i. Après un temps x ou ($t_o + x = t_x$), sa longueur finale est L_f.

On peut alors définir:

1° L'élongation absolue (entre t_o et t_x)

$$\Delta L = L_f - L_i$$

2° L'élongation relative, exprimée en %

$$\%L = (L_f - L_i / L_i).100 = (\Delta L / L_i).100$$

3° La vitesse moyenne d'élongation

$$v = \Delta L / \Delta t$$

avec L_i, L_f et ΔL en mm et t ou Δt en heures

Stimulation ou inhibition de l'élongation par un effecteur.

Etudions l'effet d'un effecteur qui modifie l'élongation de segments. Au temps t_o la longueur des segments est L_i.

Après un temps x de traitement les segments témoins ont une longueur finale: $L_f(TE)$ et les traités: $L_f(TR)$.

On aura donc $\Delta L(TE) = L_f(TE) - L_i$

et $\Delta L(TR) = L_f(TR) - L_i$

le % d'effet de l'effecteur = $\Delta L(TE) - \Delta L(TE)/\Delta L(TE) \cdot 100$

ou = $L_f(TR) - L_f(TE)/L_f(TE) - L_i \cdot 100$

si le % d'effet est positif, on a une stimulation.

si le % d'effet est négatif, on a inhibition.
si le % d'effet est nul, l'effecteur présumé n'a aucune action.

4.2 Poids frais ou poids sec

Comme pour l'élongation on peut définir les variations de PF ou PS de diverses façons:

ΔPF ou ΔPS: variation absolue

%PF ou %PS: variation relative en %

4.3 Teneur en eau (ou humidité)

La teneur en eau absolue des tissus est égale à la différence PF - PS. On préfère l'exprimer sous forme de valeur relative par rapport au PF, beaucoup plus représentative.

Teneur en eau relative (% H_2O)

% H_2O = PF - PS/ PF . 100 (en g d'eau pour cent g PF)

CHAPITRE III

RNA ET PROTEINES : EXTRACTION, DOSAGE

Pour déterminer le taux en RNA total des segments d'épicotyle étudiés précédemment, que ce soit dans la phase antérieure ou postérieure à l'élongation, il était nécessaire de trouver une technique de base susceptible de modifications pour être appliquée aux tissus végétaux. D'autre part, elle devait être suffisamment précise pour que de très faibles quantités d'acide ribonucléique puissent se déterminer.

L'extraction quantitative et le dosage des acides nucléiques dans les plantes présentent de nombreuses difficultés, non seulement dans l'extraction et la séparation différentielle du RNA et du DNA, mais surtout dans l'élimination des substances contaminant l'extrait. Tous les processus d'extraction quantitative sont basés sur l'une ou l'autre des techniques décrites par SCHNEIDER (1945), SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) ou OGUR et ROSEN (1950) et utilisées, à l'origine, pour des tissus animaux ou des micro-organismes. Ces méthodes, cependant, ne peuvent

être appliquées telles quelles aux végétaux. Elles doivent subir, dans ce cas, de nombreuses améliorations.

Des extractions préliminaires sont nécessaires pour bloquer l'activité de certaines enzymes du catabolisme des acides nucléiques, comme les nucléases, susceptibles de les dégrader partiellement, surtout si les tissus sont frais. En même temps, on élimine les composés nucléotides puriques ou pyrimidiques libres (ADP, ATP, UDP-glucose etc.), les coenzymes (NAD, NADP), les phosphates inorganiques et les sucres; tous sont solubles, à froid, dans les acides concentrés. Les lipides et surtout les phospholipides sont extraits par des solvants organiques. Ces étapes préparatoires assez longues ont pour effet d'écarter de l'extrait la plupart des substances pouvant interférer lors du dosage des acides nucléiques.

1. Extractions préliminaires

1.1. Substances solubles à froid dans les acides

Il est préférable de traiter d'abord les tissus par un acide froid puis d'extraire les lipides par les solvants organiques. De cette façon l'extrait, sous forme de poudre sèche, pourra facilement se conserver pour une courte durée et à basse température. Les acides les plus communément utilisés sont l'acide perchlorique ou APC ($HClO_4$) et l'acide trichloracétique ou ATC (CCl_3-COOH). SMILLIE et KROTKOV (1960) d'une part, DAVIDSON et al. (1951)

d'autre part, estiment que l'APC 1-2 N provoque une certaine perte en acides nucléiques, alors que plus dilué (0,2 N) il extrait incomplètement le phosphore non nucléique. Par contre, l'ATC 10 % (p/v) est suffisant pour éliminer ce phosphore en trois fois (HOLDGATE et GOODWIN, 1965), sans perte discernable en RNA et DNA (DAVIDSON et al., 1951). L'emploi d'éthanol à la place d'acide, largement utilisé pour l'extraction des nucléotides sur des micro-organismes, se pratique rarement quand il s'agit de tissus végétaux, probablement à cause de sa moindre efficacité. De plus, l'éthanol peut solubiliser certains pigments (carotènes, chlorophylles) pouvant gêner une éventuelle analyse du pool des nucléotides.

1.2 Substances lipidiques

Pour extraire les composés de nature lipidique (phospholipides principalement) on utilise couramment des solvants organiques, à chaud ou à température ambiante. Dans ce cas, toute trace d'acidité résiduelle peut provoquer une dégradation des acides nucléiques. MARKO et BUTLER (1951) constatent que deux lavages par l'éthanol froid sont insuffisants pour éviter que le DNA ne soit transformé en acide apurinique qui peut être partiellement hydrolysé lors d'un traitement alcalin (cf. chap. III, 2.3). On peut neutraliser l'acide restant par un lavage immédiat à l'éthanol 90 % saturé en acétate de sodium comme le préconisent HUTCHINSON et MUNRO, 1961); deux lavages semblent suffire. L'extrait, débarrassé des acido-solubles est traité par les solvants (ou mélanges) suivants: éthanol, éther et chloroforme. La présence de ce dernier paraît indispensable lorsque l'extraction se pratique à température du laboratoire (HOLDGATE et GOODWIN, 1965). L'éther

s'utilise en dernier; on l'élimine par évaproration sous vide. L'extrait ainsi délipidé se présente sous forme de poudre blanche et se conserve dans un dessiccateur, au congélateur.

2. Séparation différentielle du RNA et du DNA

Les méthodes spéciales pour l'obtention des acides nucléiques non dégradés (DAVIS et ALLEN, 1957; YAMANA et SIBATANI, 1960) ne sont pas quantitatives. Seule l'hydrolyse des macromolécules par des acides, chauds ou froids, et des alcalis parait satisfaisante.

2.1 Extraction du RNA par un acide froid

La méthode de OGUR et al. (1951) est basée sur la différence de solubilité du RNA et du DNA dans les acides. Pour les tissus végétaux, le RNA est extrait par $HClO_4$ 1 N à 4°C pendant 18 h et le DNA par le même acide, pendant 20 mn, à 80°C. Mais le RNA obtenu ne présente pas un spectre uv correct. KESSLER et ENGELBERG (1962) montrent que la séparation et l'extraction du RNA et du DNA de feuilles de pommier sont incomplètes. D'autre part, le RNA est contaminé par des produits de dégradation du DNA lors du traitement à l'acide froid (HEYES, 1960). Le dosage du RNA par l'orcinol, selon CERIOTTI (1955) ou du phosphore (ALLEN, 1940) indique qu'il est fortement contaminé.

2.2 Extraction du RNA par un acide chaud

SCHNEIDER (1945) propose une extraction du RNA et du DNA, à partir du résidu ne contenant plus d'acido-solubles ni de lipides, par l'ATC dilué (5 %) à 90°C, pendant 50 mn. Dans ces conditions, RNA et DNA sont dégradés et solubilisés. Leur dosage s'effectue par des réactions colorimétriques spécifiques sur le ribose (par l'orcinol) et le désoxyribose (par la diphénylamine, selon la méthode modifiée de BURTON, 1956). HOLDGATE et GOODWIN (1965) utilisant cette méthode sur des tissus de seigle ($HClO_4$ 0,5 N à 70°C pendant 20 mn et trois fois de suite) montrent que l'estimation du RNA à l'orcinol est vingt fois trop élevée; le P-RNA est aussi trop grand, l'excès de phosphore dérivant probablement de phospho-protéines. Quant au spectre uv, il n'est pas caractéristique et contient de nombreuses substances interférentes.

2.3 Hydrolyse alcaline selon SCHMIDT et THANNHAUSER (1945)

Cette méthode est basée sur la différence de stabilité entre RNA et DNA vis-à-vis des alcalis. Les polyribonucléotides sont dégradés par les hydroxydes de métaux alcalins (NaOH et KOH), à chaud, en un mélange équimoléculaire d'isomères identifiés comme étant les ribonucléosides 2' et 3' phosphate (BROWN et al., 1953; CAVALIERI, 1953). La fig.3 montre le mécanisme de la fission alcaline. On a d'abord rupture de la liaison P-O (C-5') phosphodiester et formation d'un dérivé cyclique (nucléoside 2', 3'-phosphates) instable. Les ions OH^- peuvent facilement l'attaquer, et ouvrir l'une ou l'autre

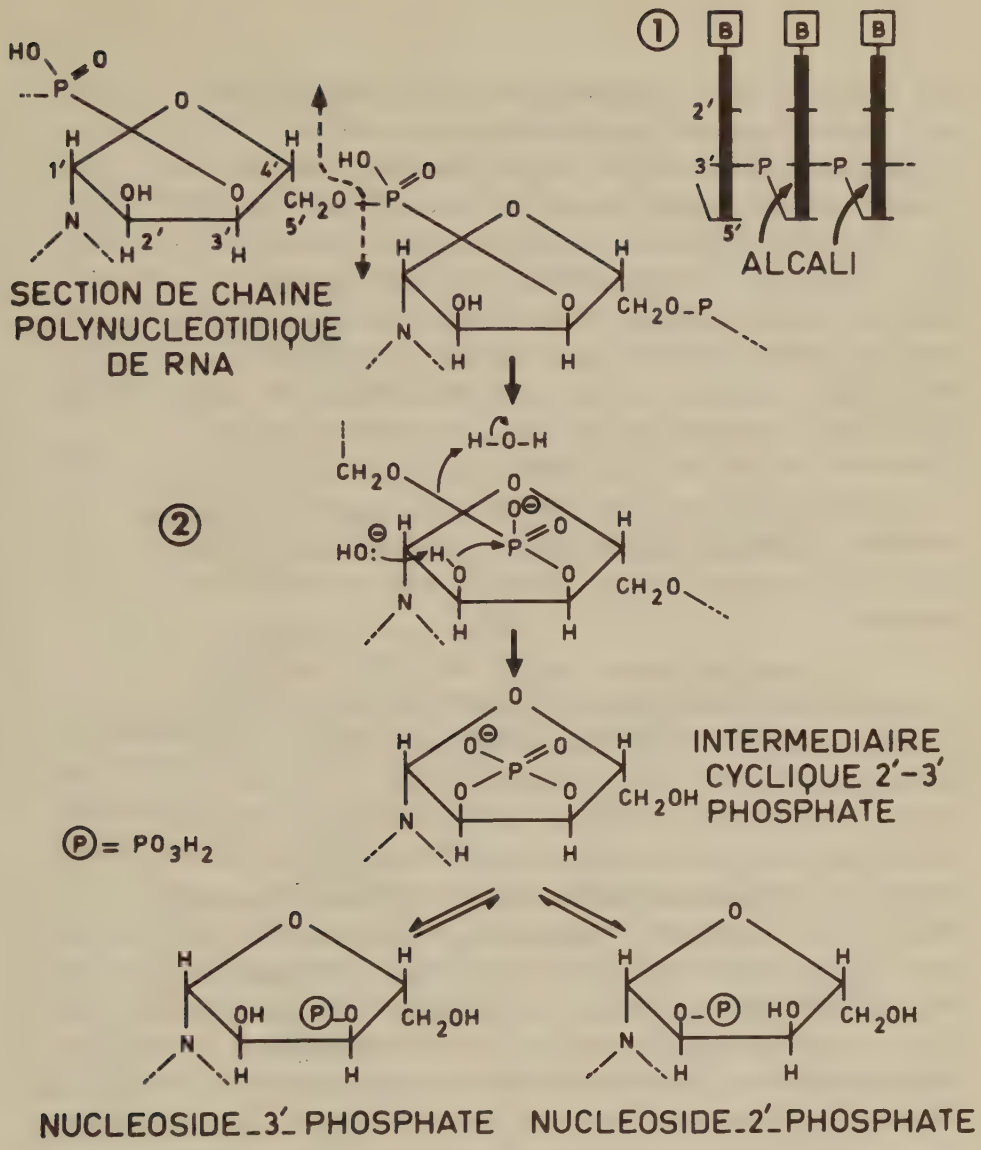


Fig.3 - Mécanisme de l'hydrolyse alcaline du RNA

1 Schéma montrant une séquence du RNA et les liaisons sensibles à l'attaque des solutions alcalines.

2 Détail de la réaction chimique au niveau d'une de ces liaisons.

des liaisons C-O-P, avec production de nucléosides 2' ou 3'-mono-phosphate, non précipitables en milieu fortement acide. Une telle participation du groupe hydroxyle vicinal cis-2' réactionnel est impossible dans le cas d'un désoxyribose, ce qui explique la stabilité bien connue des polydésoxyribonucléotides en milieu alcalin. Ils sont tout au plus dépolymérisés en chaînes d'oligonucléotides encore assez longues et de poids moléculaire suffisamment haut pour être précipitées par les acides concentrés froids. Dans certaines conditions (acidité), le DNA se transforme en acide apurinique par perte de ses bases puriques. De ce fait, le groupe aldéhydique du désoxyribose possède un hydroxyle libre en C-4' et le polymère devient remarquablement sensible aux alcalis.

La dépolymérisation du RNA, pour être complète, s'effectue par une solution alcaline 0,3 à 0,5 N pendant 16-20 h, à 26-37°C (DE DEKEN-GRENSON et DE DEKEN, 1959; BONNER et ZEEVAART, 1962; FUKASAWA, 1963). La précipitation du DNA et des protéines, après hydrolyse, s'obtient par acidification du milieu à pH 1-1,5 et à froid (0°C ou moins). On utilise préférentiellement l'APC (1,5 N) pour deux raisons: il permet d'éliminer les ions potassium (si on hydrolyse par KOH) sous forme de cristaux insolubles de perchlorate de potassium; d'autre part, il absorbe moins l'uv (à 260 nm) que l'ATC, ce qui est un avantage non négligeable si on veut doser le RNA par spectrophotométrie.

Le RNA obtenu présente un spectre uv plus ou moins caractéristique suivant le matériel végétal utilisé. Ainsi, s'il est convenable dans le cas de racines de Vicia faba, il l'est beaucoup moins pour des coléoptiles d'Aveña

(ESNAULT, 1967). Il est alors nécessaire de le purifier sur charbon actif ou sur colonne d'échangeur d'ions genre Dowex 1 (INGLE, 1962). Même après ces traitements, la concordance des résultats donnés par le dosage des phosphates, le test orcinol ou la mesure de la DO en uv n'est pas parfaite; le RNA semble contenir encore des phosphates non-RNA et des dérivés sucrés qui interfèrent lors des dosages colorimétriques et dont la quantité augmente avec l'âge des tissus.

3. Extraction et dosage du RNA d'épicotyles de Pois

3.1 Technique d'extraction

La méthode utilisée a pour base celle de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) avec les modifications apportées par INGLE (1962), HOLDGATE et GOODWIN (1965). Les différentes phases du processus d'extraction sont schématiquement indiquées dans la fig. 4 .

0,2 à 1 g de tissus (PF) sont lyophilisés durant environ 18 h, au moyen d'un lyophilisateur SECFROID ou congelés immédiatement par de l'azote liquide. Le matériel est broyé dans un petit mortier préalablement conservé au congélateur, à -45°C. L'opération est facilitée par l'adjonction de sable de quartz (ce dernier n'étant pas parfaitement pur, on le traite plusieurs fois par HCl concentré, puis par de la soude à 20 % avant de le laver soigneusement à l'eau bidistillée et de le sécher à 150°C). Lorsque les tissus sont réduits en fine poudre, on ajoute 6 à 8 ml d'ATC 10 % (p/v) froid (0°-2°C), par petites portions, en

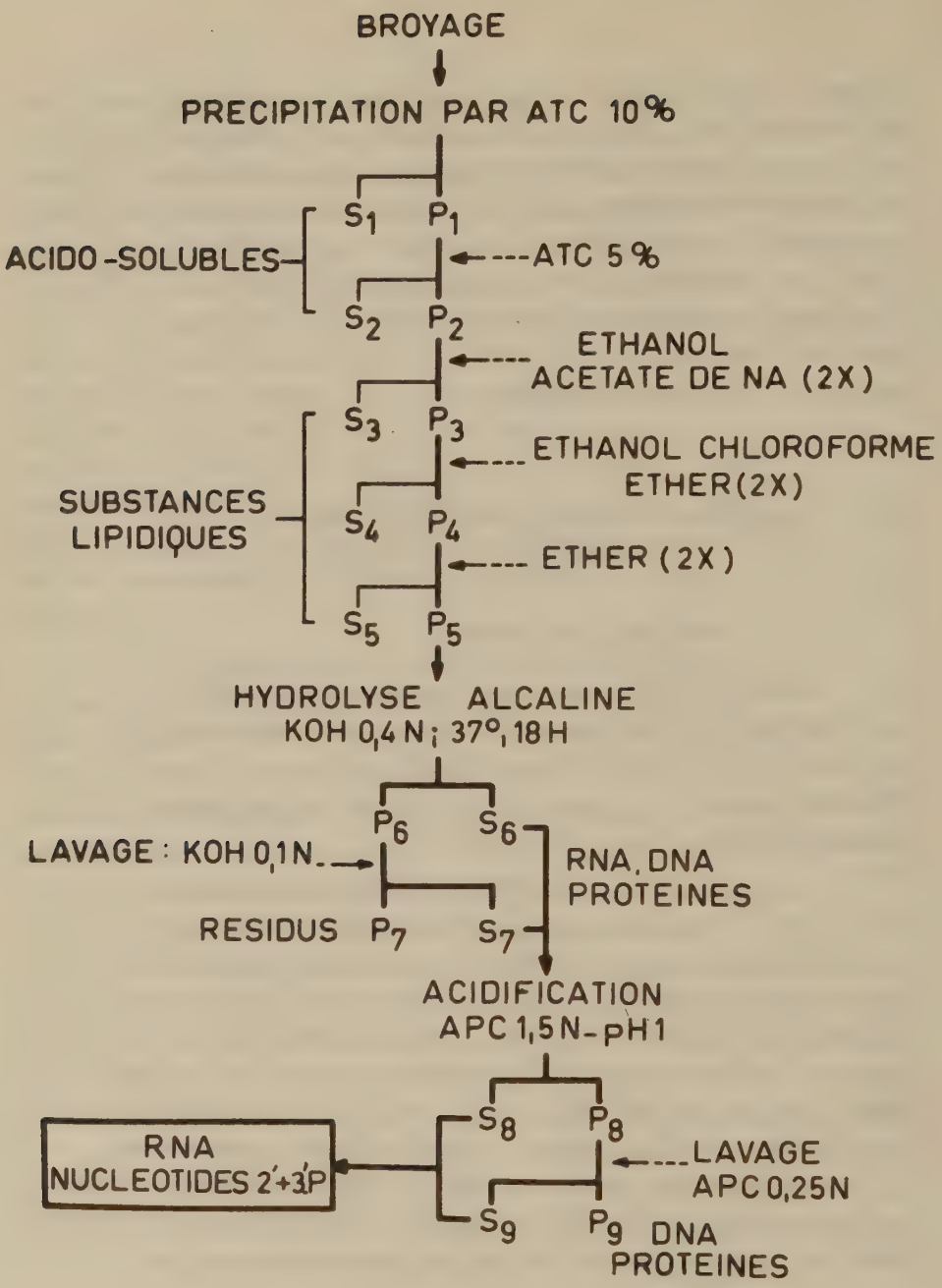


Fig.4 - Schéma du processus d'extraction du RNA

homogénéisant bien le tout. L'ensemble est récolté dans un tube à centrifuger et maintenu au réfrigérateur pendant 15 mn. Après centrifugation (25 min; 18'000 x g; 0°- 2°C) sur centrifugeuse PHYWE, le précipité est lavé par 8 ml d'ATC 5 % et séparé de la même façon, puis remis en suspension dans 6 ml d'éthanol 90 % saturé en acétate de sodium. Le culot est repris une seconde fois par cette solution. A ce stade, on vérifie que toute l'acidité résiduelle a disparu par mesure du pH (environ 7). Après une nouvelle centrifugation, le précipité résultant est extrait successivement (15 mn à température ambiante) par les mélanges organiques suivants: éthanol 95 %-chloroforme-éther (2:1:1) et éther (deux fois chacun). Le résidu est séché sous vide pour évaporer l'éther restant, puis réduit en poudre à l'aide d'une baguette de verre.

L'hydrolyse alcaline du RNA se pratique de la manière suivante: la poudre de Pois est reprise par 2 ml de KOH 0,4 N et l'homogénat placé dans une étuve à 37°C pendant 18 h, avec agitation intermittente. Les tubes contenant l'hydrolysat doivent être hermétiquement fermés. Le résidu alcali-insoluble (débris cellulaires) séparé du surnageant par centrifugation est lavé par 1ml de KOH 0,1 N. Le surnageant précédent plus la solution de lavage sont recueillis dans un tube côté et leur volume ajusté à une valeur exacte (une prise aliquote 0,5 ml) est réservée pour la détermination du taux en protéines; on place ce dernier dans un mélange réfrigérant (glace fondante et chlorure d'ammonium: -7°C), pendant quelques minutes, en évitant toute congélation du milieu. On acidifie la solution alcaline en ajoutant goutte à goutte de l'APC 1,5 N (1 ml). Il est nécessaire d'agiter rapidement la solution sur un vortex pendant cette phase, d'une part pour éviter une

réaction exothermique locale, d'autre part pour créer un gradient acide et précipiter le mieux possible le DNA et les protéines. On s'assure alors que le pH de l'extrait soit suffisamment acide (pH de 1 à 1,5) et on laisse reposer une heure à 2°C. On centrifuge (25 min- 18'000 x g; 0°-2°C); on lave le culot par 1 ml d'APC 0,25 N. Les surnageants réunis constituent la fraction RNA, mélange de ribonucléosides 2'+ 3' phosphate. On peut la conserver quelques jours au réfrigérateur (4°C).

3.2 Spectre en UV du RNA extrait

Avant de doser le RNA extrait des épicotyles de Pois par spectrophotométrie en uv, il était indispensable d'étudier son spectre pour savoir s'il était correct et, dans le cas contraire, estimer le degré de contamination avec élimination, si possible, des substances parasites interférentes. Toutes les études de spectre ont été réalisées sur un spectrophotomètre ZEISS PM Q II.

Le RNA, comme le DNA, absorbent fortement la lumière ultra-violette, avec un maximum d'absorption à 260 nm environ et un minimum compris entre 230 et 240 nm. Cette propriété est essentiellement due aux dérivés puriques et pyrimidiques qui possèdent un système de double liaisons conjuguées; leur coefficient d'extinction molaire (ε), au maximum d'absorption, est très élevé: à 260 nm, il est de 14'200 pour l'adénosine, 8'000 environ pour la guanine et l'uridine et 6'200 pour la cytidine, à pH 2. Ce coefficient varie avec les substituants et la forme ionique des groupes acides ou basiques du noyau aromatique (l'extinction est donc dépendante du pH). La

position du groupe phosphate n'affecte pas sensiblement le spectre des nucléotides puriques, mais peut avoir une influence sur celui des dérivés pyrimidiques. Quant à la présence d'un ribose ou d'un désoxyribose, elle n'entraîne aucune modification, sauf à des valeurs de pH assez hautes pour ioniser les groupes hydroxyles. Le spectre des polynucléotides est approximativement celui du mélange des mononucléotides qui le constituent. Cependant, la somme des extinctions de ces différents composants est toujours supérieure à l'extinction du polynucléotide de haut poids moléculaire correspondant. Cet effet "hyperchrome" serait provoqué par une altération de l'énergie de résonance des bases associées et la présence de liaisons hydrogène. Ainsi, un RNA hautement polymérisé dégradé par voie enzymatique (RNases) ou chimiquement (alcalis) présente une augmentation de son absorption en uv de 30 à 33 % (HOTCHKISS, 1957). Cette propriété permet d'étudier le degré de dénaturation d'un acide nucléique.

Spectres étudiés. L'étude a été faite pour les longueurs d'onde comprises entre 220 et 310 nm, en milieu acide (APC); pH 1. La fig.5 représente les spectres établis pour les RNA suivants:

- RNA extrait des épicotyles de Pois par la méthode décrite précédemment. (1)
- Le même, mais purifié par absorption sur du charbon activé (Norit OL) et élué par un mélange éthanol aqueux-ammoniaque (HOLDGATE et GOODWIN, 1965). Après évaporation sous vide (30°C), le résidu est repris par l'APC (à la même concentration que l'APC restant dans les extraits). (2)
- RNA commercial (Fluka) hydrolysé et acidifié de la même façon que le RNA de Pois. (3)

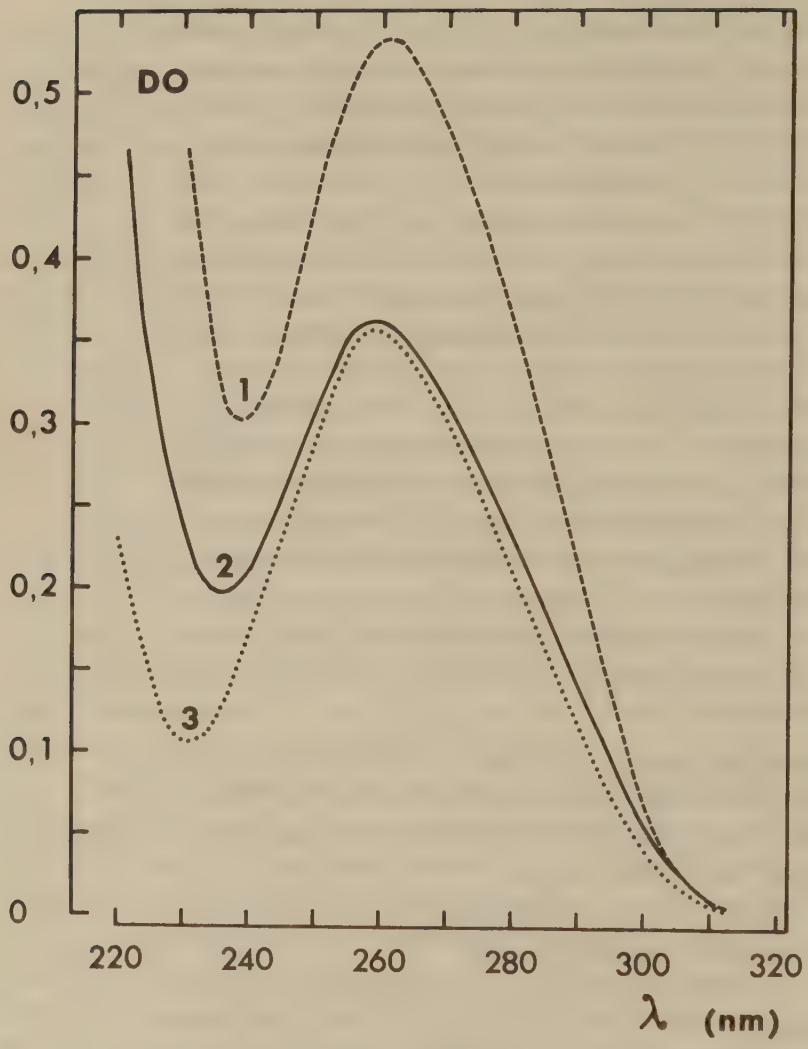


Fig.5 - Spectres d'absorption du RNA

1 RNA extrait des épicotyles de Pois
2 Extrait 1 purifié par traitement au charbon actif (Norit "OL".
3 RNA commercial hydrolysé et traité comme le RNA 1.

Quelques caractéristiques. Elles sont indiquées dans le tableau 1 . Le maximum d'absorption est, dans les trois cas, approximativement à 260 nm (± 2 nm). Le minimum, par contre, est sensiblement différent; proche de 240 nm pour le RNA extrait, de 230 pour le RNA commercial. La purification entraîne un léger déplacement du minimum vers des longueurs d'onde plus courtes. La détermination du rapport entre la densité optique (DO) ou l'extinction (E) à certaines longueurs d'onde (230, 240, 250, 280 et 290 nm) et celle mesurée à 260 nm permettent d'avoir des indications sur la forme du pic d'absorption et d'évaluer le degré de pureté du RNA. Pour la région du spectre comprise entre 260 et 300 nm, les rapports sont assez proches, surtout entre (1) et (2), quoique légèrement supérieurs à ceux de (3). Pour la zône inférieure à 260 nm, la corrélation est nettement moins bonne et peut s'expliquer, en partie, par le déplacement du minimum d'absorption vers les longueurs d'onde plus basses. Quant au rapport entre λ Max et λ Min, s'il varie peu entre (1) et (2), il reste cependant inférieur à celui de (3). Il faut signaler que ces rapports ne sont qu'indicatifs et peuvent varier suivant l'origine et la composition du RNA utilisé.

Est-ce que le RNA extrait est contaminé par des résidus de protéine? Le problème se pose car la plupart des travaux sur l'extraction du RNA selon la méthode appliquée ici en font mention (OSBORNE, 1962). En effet, lors de l'hydrolyse alcaline à 37°C, il est possible que les protéines soient trés légèrement dégradées en peptides ou acides aminés de poids moléculaire suffisamment faible pour ne plus être précipités par l'APC à froid. Le risque d'interférence est minime puisque les acides nucléiques

TABLEAU 1

QUELQUES CARACTERISTIQUES DU SPECTRE D'ABSORPTION EN UV DU RNA EXTRAIT D'EPICOTYLE DE POIS

CARACTERES DU SPECTRE (déterminé dans l'APC;pH 1)	RNA extrait (1)	RNA extrait purifié* (2)	RNA commercial (3)
Longueur d'onde du maximum d'absorption (λMax) en nm	258-260	258-260	260
Longueur d'onde du minimum d'absorption (λMin) en nm	238-240	236	232
$\frac{DO\ (\lambda Max)}{DO\ (\lambda Min)}$[1]	1,76	1,83	3,42
$\frac{DO\ 230\ nm}{DO\ 260\ nm}$	0,94	0,66	0,29
$\frac{DO\ 240\ nm}{DO\ 260\ nm}$	0,57	0,58	0,44
$\frac{DO\ 250\ nm}{DO\ 260\ nm}$**	0,82	0,84	0,81
$\frac{DO\ 280\ nm}{DO\ 260\ nm}$**	0,69	0,64	0,59
$\frac{DO\ 290\ nm}{DO\ 260\ nm}$	0,40	0,39	0,33

* Par passage sur colonne de charbon activé 'Norit OL'

** Les rapports 250/260 et 280/260 d'une solution standard contenant les 4 nucléotides en proportions équimolaires sont respectivement de 0,78 et 0,65 (INGLE, 1962).

1 Rapport entre la DO au maximum et au minimum d'absorption.

ont un coefficient d'extinction à 260 nm 30-60 fois supérieur à celui des protéines (DAVIDSON, 1965). Celles-ci absorbent l'uv dans différentes parties du spectre:

- entre 250 et 310 nm, par la présence de certains acides aminés aromatiques (noyau benzène, indole et imadazole). Les deux plus importants sont: le tryptophane (ε= 5'550 et λMax: 278 à pH 1) et la tyrosine (ε= 1'340 et λMax: 274). Les autres (phénylalanine) absorbent beaucoup plus faiblement. Dans cette zône, l'allure du spectre du RNA de Pois (1), la bonne corrélation entre les rapports de DO à différentes longueurs d'onde, le fait que l'extinction soit faible à 290 nm et pratiquement nulle au-delà de 310 nm indiquent que la contamination due aux protéines est négligeable. En outre, la purification par passage sur colonne de charbon activé ne modifie pas son spectre.

- Entre 160 et 240 nm les protéines et les polypeptides absorbent l'uv par leur liaison peptidique; de 160 à 190 nm, par transition $n \rightarrow \pi^*$; de 200 à 240 nm, par transition $\pi \rightarrow \pi^*$, au niveau du groupe C=O. Pour cette liaison, ε= 2'800 à 250 nm. Histidine et cystéine absorbent aussi, entre 200 et 250 nm, leur spectre se confondant avec celui de la liaison peptidique. Si on considère le spectre du RNA extrait entre 220 et 250 nm, on constate que le rapport 250/260 est proche de celui du RNA commercial, mais que les autres (240/260 et 230/260) s'en écartent passablement. Ceci provient, en grande partie, du fait que leur minima d'absorption sont décalés. La purification du RNA de Pois provoque un léger déplacement de son minimum vers les courtes longueurs d'onde, et améliore le rapport 230/260; quant au rapport DO (λMax)/DO (λMin), il n'est pratiquement pas changé, restant inférieur à celui établi pour le RNA commercial. Dans cette région du spectre, on

peut penser que la purification élimine certaines substances (acides aminés ou peptides) contaminantes, mais l'amélioration est faible. Aussi, le dosage quantitatif du RNA par spectrophotométrie sera-t-il réalisé dans la région où son spectre paraît le plus correct, c'est-à-dire entre 260 et 300 nm.

3.3 Dosage du RNA

La concentration du RNA dans chacun des extraits (surnageants S_8 + S_9) se calcule suivant la technique de l'extinction différentielle. On détermine la différence de DO (ΔDO) au maximum d'absorption (260 nm) et à une autre longueur d'onde, par exemple à 290 nm, valeur habituellement choisie. La transformation de ΔDO en ug de RNA se fait par référence à une courbe-étalon établie à partir d'un RNA commercial (Fluka). Toutes les mesures sont réalisées en utilisant des cuves de quartz, sur un spectrophotomètre ZEISS PM Q II. Comme nous l'avons vu, le spectre du RNA varie avec le pH. Il est donc très important que les solutions à doser aient le même pH. Les surnageants sont conservés tels quels (milieu: APC en excès ayant neutralisé l'hydroxyde de potassium; pH 1 environ). Le RNA commercial est traité comme le RNA végétal, c'est-à-dire hydrolysé dans des conditions semblables, puis acidifié par l'APC. La proportion de base (KOH 0,4 et 0,1 N) et d'acide (APC 1,5 et 0,25 N), en volumes, reste identique. La DO à 260 et 290 nm, pour des taux croissants en RNA, se lit contre un témoin (mélange KOH-APC déjà mentionné ci-dessus), pour tenir compte de la faible absorption de l'APC. Comme montré sur la fig. 6, la courbe représentative des variations de ΔDO en fonction

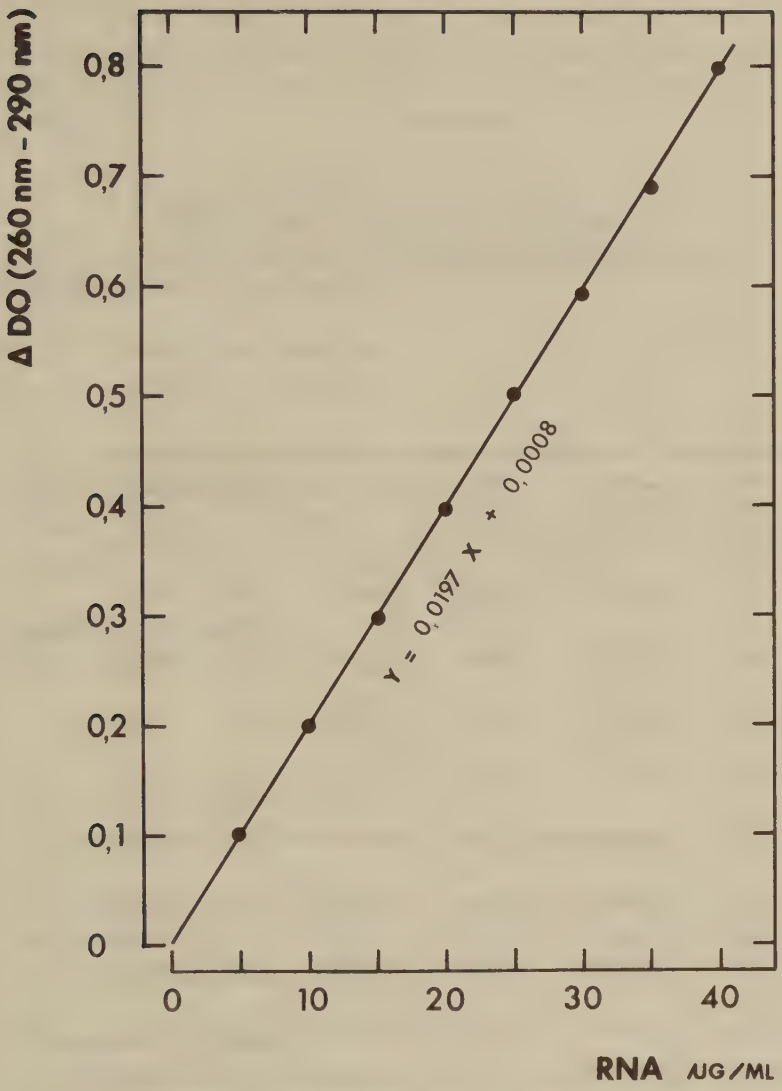


Fig.6 - Courbe standard pour la détermination du RNA

TABLEAU 2

DO DU RNA A 260 ET 290 NM POUR LA DETERMINATION DE LA COURBE-ETALON

RNA µg/ml	DO 260 nm	DO 290 nm	ΔDO	DO 290 / DO 260	RNA* / ΔDO
5	0,155	0,053	0,102	0,34	49,0
10	0,296	0,098	0,198	0,33	50,5
15	0,437	0,141	0,296	0,32	50,6
20	0,583	0,187	0,396	0,32	50,5
25	0,742	0,242	0,500	0,33	50,0
30	0,880	0,288	0,592	0,33	50,6
35	1,035	0,345	0,690	0,33	50,7
40	1,180	0,385	0,795	0,33	50,3

* La quantité de RNA (µg/ml) est donnée par: DO (260 - 290) x 50,2. INGLE (1962) utilise cette même formule, mais avec un coefficient de 48.

de la concentration en RNA est rectiligne. Si on pose Y pour la ΔDO (260 nm - 290 nm), et X pour la concentration du RNA, l'équation de la droite de régression est la suivante:

$$Y = 0{,}0197\ X + 0{,}0008$$

coéfficient de corrélation: 0,9999

Les calculs de la ΔDO et du facteur la reliant au taux de RNA figurent dans le tableau 2.

4. Dosage des protéines

La teneur en protéines des extraits est déterminée sur une prise de l'hydrolysat alcalin, avant la phase d'acidification. La méthode de dosage utilisée est celle de LOWRY et al. (1951), dérivée de FOLIN-WU.

Réactifs de dosage:

A.- solution contenant: Na_2CO_3 0,2 N
NaOH 0,2 N
$NaKC_4H_4O_6$ (tartrate de K, Na) 7.10^{-4}M.

B.- solution de $CuSO_4$ 0,02 N

C.- mélange de 50 parties de A pour 1 partie de B.

D.- Réactif de FOLIN-CIOCALTEU (acide phosphomolybdotungstique, fourni par MERCK-n° 9 001) dilué 1:1 (v:V) par de l'eau de façon à ce que la solution finale soit 1 N acide.

Processus de dosage:

A 1 ml d'échantillon à doser, convenablement dilué (15 à 200 µg de protéine) on ajoute 5 ml du mélange C. Après 15 min, on rajoute très rapidement 0,5 ml du réactif dilué de FOLIN, tout en agitant sur un VORTEX. Après 60 min, on

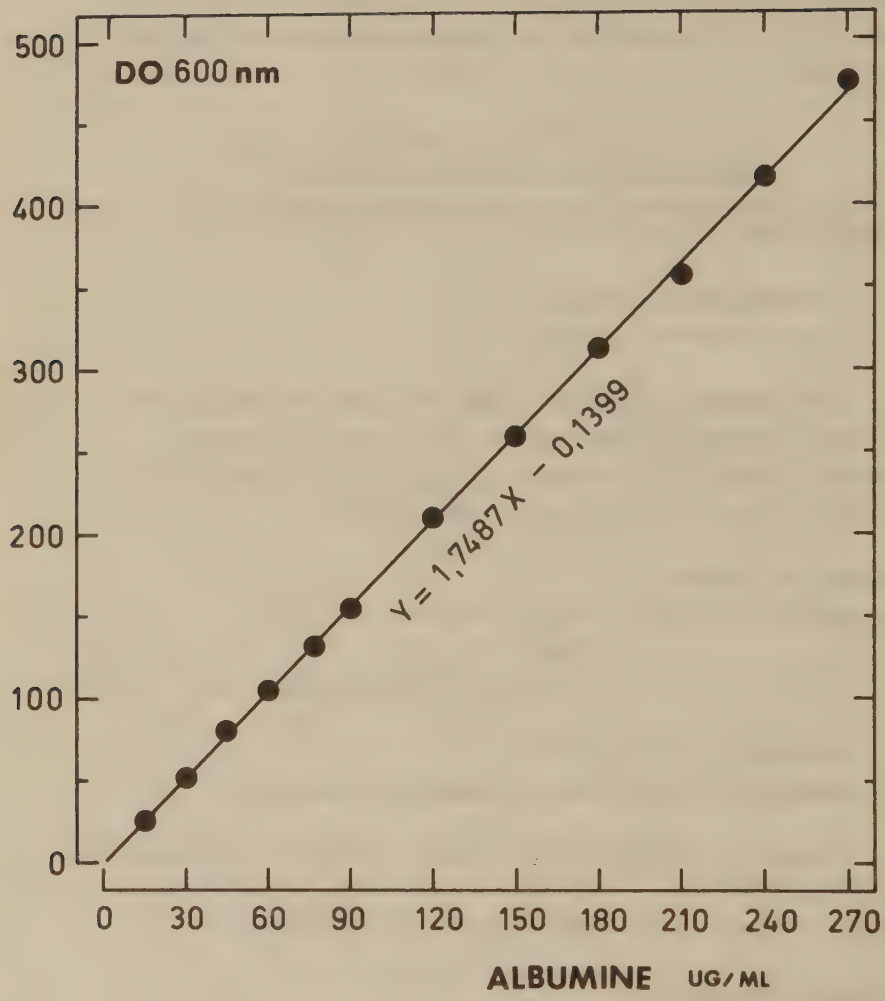


Fig.7 - Courbe standard pour la détermination des protéines selon LOWRY et al.(1951)

mesure la densité optique à 600 nm, sur un KLETT-SUMMERSON modèle 800 3 (filtre 60). La coloration obtenue est stable pendant 2 hr.

La courbe standard est obtenue à partir de BSA (albumine sérique bovine: fraction V, SIGMA). La courbe résultante est une droite (fig. 7). Si Y est la DO à 600 nm et X la concen - tration en BSA (µg/ml), l'équation de la droite de régression obtenue est :

$$Y = 1,7487\ X - 0,1399$$

coéfficient de corrélation: 0,99998

CHAPITRE IV

GRADIENTS DE CROISSANCE LE LONG DE L'AXE EPICOTYLAIRE

1. Introduction

Les relations pouvant exister entre, d'une part, la croissance cellulaire, contrôlée par les phytohormones et, d'autre part, la synthèse des acides ribonucléiques (RNA), ont été généralement établies sur des expériences "in vivo" et "in vitro", associées à des traitement externes. KEY (1969), dans une mise au point, a présenté et discuté la plupart des travaux relatifs à ce sujet. Par contre, sur la plante intacte, non traitée, la distribution du RNA associée à la croissance endogène n'a été que rarement étudiée (WOODSTOCK et SKOOG, 1960 et 1962; PILET et BRAUN, 1970).

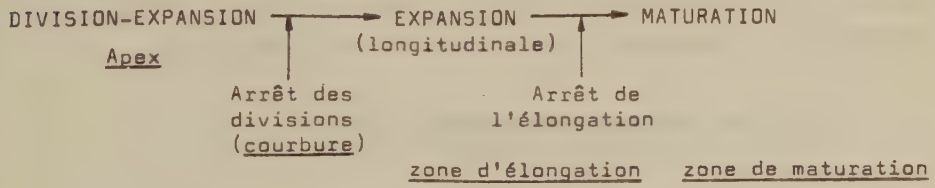
Nous avons donc tenté de cerner d'avantage ce problème au niveau de la plante non modifiée, en établissant sur un organe défini des gradients physiologiques (croissance définie par les para - mètres habituels) ou des gradients biochimiques concernant la distribution du RNA (et des protéines). L'organe en question est l'hypocotyle de Pois (zone d'élongation). Puis, cette étude faite, nous avons essayé d'intégrer nos résultats dans un contexte physio - logique plus important,impliquant les auxines et quelques uns

de leurs régulateurs (par exemple, les enzymes du catabolisme auxinique). Enfin, certains aspects de l'influence des auxines sur la croissance tissulaire ont été mis en évidence.

L'épicotyle de Pois a l'avantage de présenter des régions distinctes bien différenciées tant physiologiquement que morphologiquement. On trouve successivement, depuis le haut:

- L'apex: il contient les "initiales" entourées de tissus méristèmatiques définis (dôme apical, méristème subapical, primordia foliaires etc) désignés comme euméristème (ANDERSEN, 1972). Le méristème subapical ou méristème d'élongation primaire (SACHS, 1965) produit les cellules nécessaires à l'élongation future de la tige. Le reste de l'euméristème serait responsable des autres changements morphologiques. Les cellules de l'apex ont l'aspect typique de celles qu'on trouve dans les tissus en division; isodia - métriques, de dimension réduite, volume vacuolaire restreint- nombreuses petites vacuoles-volume nucléaire important. L'apex est le site essentiel de synthèse des auxines.
- La courbure apicale ("hook"): c'est une zone de transition, marquée par une certaine expansion des cellules et l'arrêt des mitoses.
- La région subapicale: c'est la zone type de l'élongation cellulaire. Les cellules (à paroi squelettique primaire) s'allongent progressivement et atteignent bientôt leur taille définitive. La vacuolisation augmente et, en fin d'élongation, occupe une très grande partie du volume cellulaire.
- La zone de maturation: plus bas, les cellules développent leur paroi secondaire et s'épaississent.

Ainsi, peut-on trouver sur un même épicotyle des tissus à des phases de la croissance bien précises, simplement d'après leur situation sur l'axe et leur morphologie.
Schématiquement on peut représenter l'épicotyle comme suit:



2. Croissance "in situ" de la région subapicale

2.1 Méthode

La région subapicale des épicotyles de Pois est divisée en segments qui sont repérés par la méthode du marquage à l'encre de Chine. Ces segments sont, sur l'axe de la tige, situés à des distances croissantes d'un point O de référence; ce-dernier est localisé immédiatement sous l'ébauche du premier nœud apical, au début de la courbure de l'apex. Les tissus sous jacents sont en phase d'élongation sans divisions. Les segments sont désignés, conventionnellement, par la lettre S suivi d'un indice chiffré; cet indice représente la distance en mm séparant l'extrémité supérieure du segment du point de référence O.(fig.9). La longueur initiale des segments est de 5 mm (± 0,02 mm) exceptée celle du segment S'_0 qui n'a que 3 mm.

150 plantules dont l'épicotyle est ainsi marqué sont remises en culture pendant 22 hr; après ce laps de temps, les marques se sont déplacées, entraînées par les tissus en élongation. On mesure alors les variations de longueur pour chaque série de segment (fig.10).

Au début de l'expérience (temps t_o) et après 22 hr de croissance (temps t_{22}), une partie des plantules est mise en réserve. On excise les différents segments (perpendiculairement à l'axe), puis on mesure leur poids frais (PF), leur poids sec (PS) et leur teneur en eau (ou humidité relative: T_{eau}), comme indiqué dans le chapitre II. On procède aussi à l'extraction du RNA et des protéines, puis à leur dosage (Chap. III).

2.2 Gradients de croissance

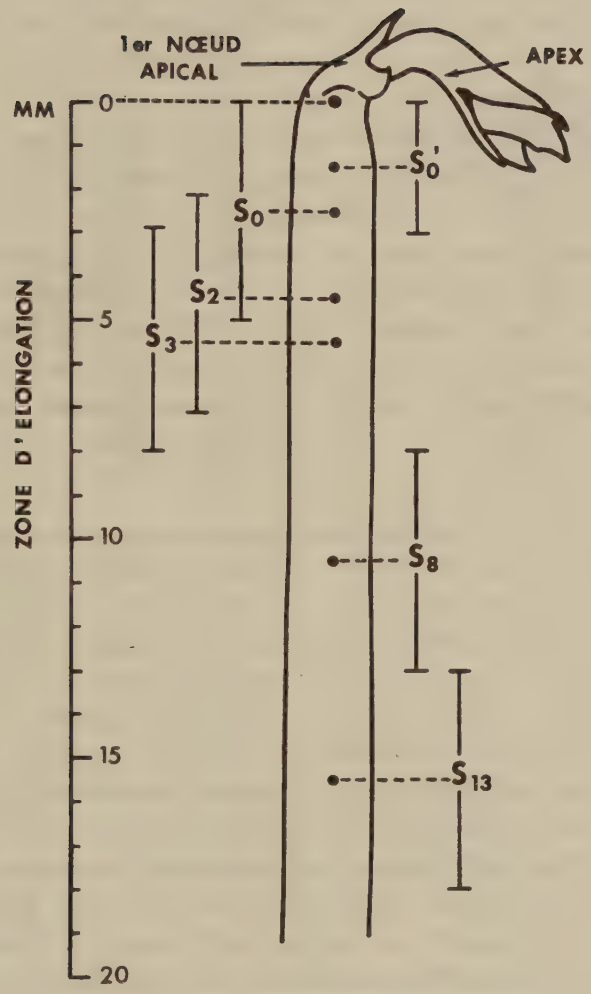


Fig. 9 - Position relative des segments sur l'axe

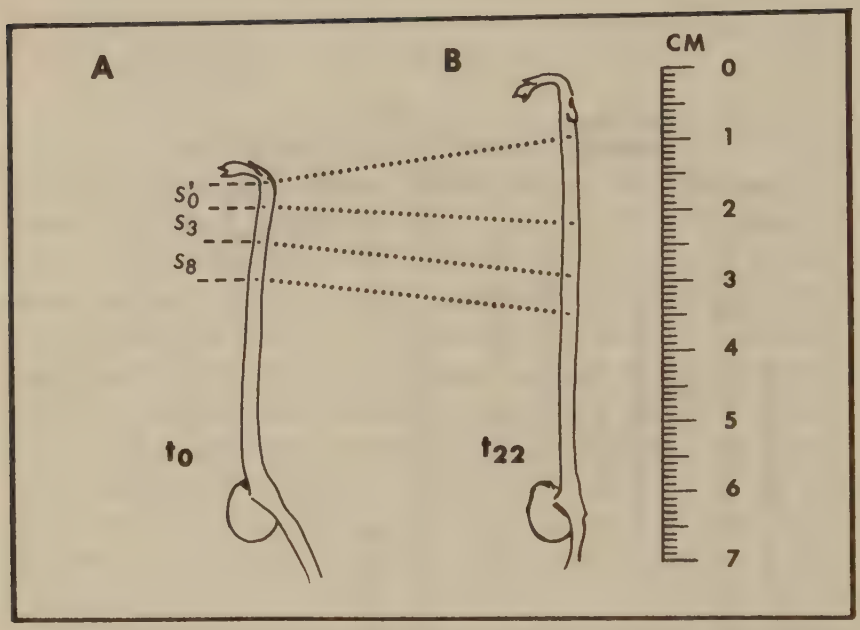


Fig. 10

ELONGATION DE L'EPICOTYLE

A : les segments S'_0, S_3 et S_8 sont repérés sur l'axe (temps t_o).

B : les mêmes segments après 22 heures de croissance (temps t_{22}).

2.2.1 Elongation et RNA

L'élongation absolue des segments (tableau 3) décroît rapidement lorsque la distance moyenne des segments, repérée sur l'axe ayant pour origine le point O, augmente. Le maximum de croissance endogène est réalisée dans les 5 premiers mm; par contre, les tissus situés à plus de 13 mm du point de référence ne présentent pratiquement plus d'allon - gement et entrent dans leur phase de maturation. Entre ces extrèmes, la croissance est modérée ou faible. Si on reporte les variations relatives de l'élongation, en % par rapport à la longeur initiale, en fonction de la distance séparant la position moyenne des segments à l'origine de l'axe, on constate (fig.11) que la courbe obtenue est hyperboliforme; celà signifierait que l'élongation est, dans une certaine mesure, inversément proportionnelle à la distance entre l'apex et le point où elle est déterminée.

La teneur en RNA, pour chacun des segments, a été rapportée à différents critères: nombre de sections, poids frais initial ou poids sec initial (tableau 4); la concentration interne du RNA au temps t_o diminue, comme pour l'élongation, c'est-à-dire quand la distance des segments à l'apex augmente. Pour chaque segment, la variation relative (exprimée en % par rapport à la valeur initiale) désignée par % RNA, représente la quantité de RNA biosynthétisé au cours des 22 hr de croissance. Elle est assez faible mais mesurable. En fait, seules les sections S_0 et S_2 présentent une augmentation significative de la formation du RNA. Plus bas, la synthèse est équilibrée par les processus de catabolisme qui peuvent, comme dans le segment S_{13}, devenir prépondérents (la perte de RNA peut être aussi due à l'excision et au délai de temps pris par les manipulations avant que l'extraction soit réalisée).

La teneur en RNA le long de l'axe et la croissance endogène (mesurée par l'élongation) évoluant dans le même sens; en fait,

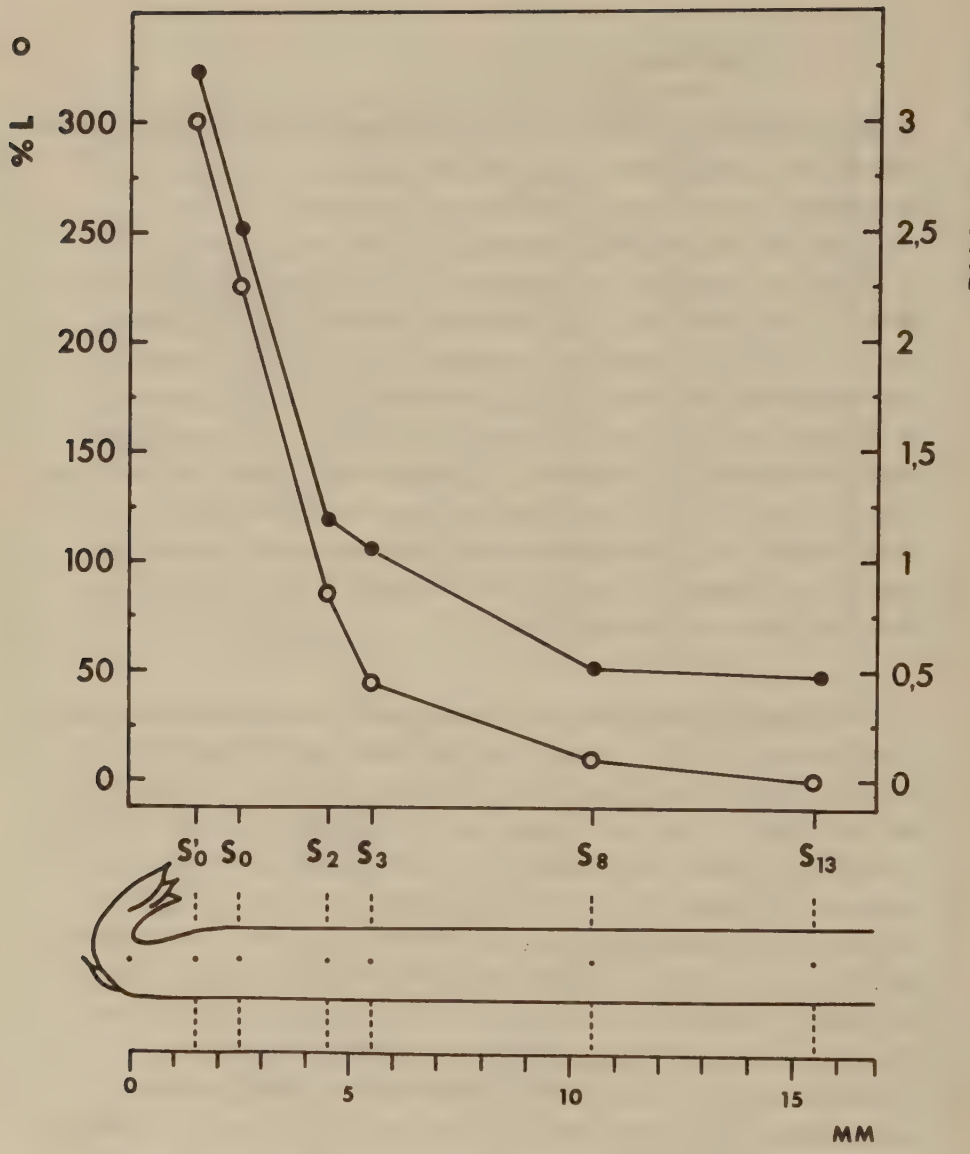


Fig.11 - Variations de l'élongation relative (% L) et de la teneur initiale en RNA (mg/g PF) en fonction de la position des segments sur l'axe.

La distance séparant le milieu des segments à l'origine est en mm.

TABLEAU 3

ELONGATION "IN SITU" DES SEGMENTS D'EPICOTYLE APRES 22 HEURES DE CULTURE

L_i et L_f: longueur initiale et finale en mm (± l'écart-type à la moyenne). ΔL: élongation absolue.

Segment	L_i	±	L_f	±	ΔL
S'_0	3	0,03	11,97	0,14	8,97
S_0	5	0,04	11,33	0,10	6,33
S_2	5	0,04	9,26	0,08	4,26
S_3	5	0,05	7,27	0,06	2,27
S_8	5	0,04	5,55	0,07	0,55
S_{13}	5	0,05	5,05	0,07	0,05

TABLEAU 4

EVOLUTION DE LA TENEUR EN RNA DES DIFFERENTS SEGMENTS AU COURS DE LEUR CROISSANCE (22 HEURES)

Le taux en RNA est rapporté aux critères suivants: nombre de segments (A), poids frais (B) et poids sec (C) initiaux. Les variations relatives du RNA par rapport à la valeur initiale sont données en %, et désignées par "% RNA".

	Segment	RNA INITIAL*	RNA FINAL*	% RNA
		µg/25 segments		
A	S'_0	423	479	(+13,2)
	S_0	597	634	(+ 6,2)
	S_2	328	343	(+ 4,4)
	S_3	290	298	(+ 2,7)
	S_8	146	145	(- 0,7)
	S_{13}.....	159	149	(- 6,3)
		mg /g PF		
B	S'_0	3,222	3,646	
	S_0	2,521	2,677	
	S_2	1,173	1,229	
	S_3	1,057	1,084	
	S_8	0,513	0,508	
	S_{13}.....	0,498	0,466	
		mg /g PS		
C	S'_0	33,44	37,85	
	S_0	29,62	31,43	
	S_2	17,40	18,24	
	S_3	16,78	17,19	
	S_8	9,69	9,60	
	S_{13}.....	9,39	8,80	

* Expériences réalisées avec 4 lots de 25 plantules.

Il existe des relations beaucoup plus étroites, comme le suggère la fig.11, où l'évolution du taux en RNA, pour chaque type de segment a été surimposée à la courbe de l'élongation relative.

Remarque concernant les critères poids frais (PF) et poids sec (PS).

Le taux en RNA aux temps t_o et t_{22} a été calculé sur la base des critères de croissance PF et PS initiaux. Dans le premier cas (t_o), il est logique de tenir compte des différences marquées existant entre les catégoties de segments, du point de vue PF ou PS; dans le second (t_{22}), il serait, à priori, normal de rapporter la teneur en RNA au Pf (ou PS) final. Or, ces critères ne sont pas constants; PF et PS évoluent, et différemment pour chaque type de segment. La teneur en eau varie, la paroi s'épaissit (synthèse de polysaccharides structuraux) et le taux en protéines augmente, du moins pour les tissus en croissance. La différence entre l'évolution du PF ou du PS d'un segment en pleine expansion, comme S_0, et celle d'un segment qui termine son élongation, comme S_8, est significative. Ainsi, exprimer l'évolution du RNA par rapport au PF (ou PS) final dont la valeur augmente plus rapidement que celle à laquelle ils servent de critère, ne fait que masquer le processus réel de synthèse du RNA. En fait, le RNA défini par le PF (ou PS) final a cependant une signi - fication physiologique: il décrit l'état endogène final en RNA des segments, ce qui permet de connaître, d'après les relations établies, le potentiel résiduel de croissance.

exemple: exprimons le taux en RNA, à t_o et t_{22}, selon le critère PFinitial ou PF final:

1 RNA (t_o) : 2,521 mg/g PF_i

2 RNA (t_{22}): 2,677 mg/g PF_i

3 RNA (t_{22}): 0,634 mg/g PF_f

Comparons 1 et 2; manifestement, le RNA est synthétisé pendant les 22 hr de croissance; inversément, si on compare 1 et 3, les résultats suggèrent que le RNA subit une dégradation. En fait, la dernière interprétation esr érronée car l'augmentation relative du PF_f par rapport au PF_i est de 323 % !
Par contre, la valeur 3 est physiologiquement intéressante: elle décrit l'état endogène du RNA dans le segment S_0 à t_{22}. Il est proche (tableau 4) de celui du segment S_8 au temps t_o; celà signifie que S_0, après 22 hr de croissance, est comparable à S_8, au début de l'expérience; donc que S_0 a pratiquement terminé de réaliser son potentiel de croissance.
Deux faits confirment cette interprétations: d'une part, le segment S_0 se retrouve à t_{22} dans la position qu'occupait initialement le segment S_8, sur l'axe. D'autre part, S_0 ne s'allonge plus de façon signifivative, même après 22 hr de culture supplémentaire.

2.2.2 Evolution des autres paramètres caractérisant la croissance

a/ Poids frais (PF) et poids sec (PS).

Les variations de PF ou de PS des segments sont présentées dans le tableau 5. Leur évolution est comparable à celle de l'élongation. Les segments proches de l'apex sont caractérisés par une forte augmentation du PF ou du PS. Elle est liée aux processus d'anabolisme, particulièrement actifs dans les cellules en croissance (synthèse de macromolécules, comme le RNA, les protéines ou les polysaccharides), à la restructura - tion de la paroi squelettique (multinet growth), à l'augmenta - tion du volume vacuolaire et de la densité des organelles. Les segments éloignés de l'apex, dont l'élongation est faible ou nulle, n'ont paratiquement pas de variations du PF ou du PS.

b/ Teneur en eau

Comme montré dans le tableau 5, les segments à potentiel de croissance élevé ont une teneur en eau (g eau/loo g PF)

TABLEAU 5

VARIATIONS DU POIDS FRAIS, DU POIDS SEC ET DE LA TENEUR EN EAU DES SEGMENTS

A- variations du poids frais (PF); % PF: augmentation relative du PF par rapport à la valeur initiale, en %. B- variations du poids sec (PS); % PS : aumentation relative en %. C- varia - tions de la teneur en eau, en % par g de PF.

	Segment	VALEUR INITIALE	VALEUR FINALE	%
		mg PF/25 segments		
A	S'_0	131,4	748,3	469,5
	S_0	236,9	1'001,2	323,0
	S_2	279,3	576,1	106,2
	S_3	274,6	432,9	57,6
	S_8	284,4	321,0	12,9
	S_{13}.....	319,2	345,1	8,1
		mg PS/25 segments		
B	S'_0	12,66	39,29	210,3
	S_0	20,18	54,50	170,0
	S_2	18,82	31,57	67,7
	S_3	17,31	25,24	45,8
	S_8	15,07	17,92	18,9
	S_{13}.....	16,92	18,30	8,1
		% Eau		
C	S'_0	90,36	94,75	
	S_0	91,48	94,55	
	S_2	93,26	94,52	
	S_3	93,70	94,17	
	S_8	94,70	94,42	
	S_{13}.....	94,70	94,70	

plus faible que les segments dont l'élongation est peu importante. Cette variation est le reflet de la vacuolisation qui, minime dans les cellules jeunes, occupe un large volume dans les cellules plus âgées. Il est aussi connu que l'élon - gation nécessite, pour se réaliser, une entrée d'eau dans les cellules consécutive au maintient d'une pression de turgescence élevée. La valeur finale de la teneur en eau est pratiquement identique pour tous les segments (environ 94,7 %); elle semble être le taux limite atteint par les tissus qui ont terminé leur croissance longitudinale.

c/ protéines.

L'évolution des protéines (tableau 6) le long de l'axe est pratiquement identique à celle du RNA. Cette relation n'est pas une coïncidence puisque la synthèse des protéines est contrôlée par le RNA. Leur augmentation relative (% Pr), au cours des 22 hr de croissance, est nette. Contrairement au RNA, les segments éloignés de l'apex (S_8 et S_{13}) continuent à synthétiser des protéines, quoique lentement; il est vraisemblable que ces sections contiennent encore assez de RNA pour assurer l'élargissement cellulaire et la maturation

2.2.3 Conclusion

Les expériences réalisées permettent d'avancer quelques conclusions:

- Le long de l'axe épicotylaire, les segments localisés immédiatement sous l'apex sont caractérisés par des tissus jeunes, au potentiel de croissance élevé. Leur teneur en RNA (et protéines) est haute (sur la base des 3 critères utilisés). Inversément, les segments situés plus bas ont des cellules âgées, ayant plus ou moins réalisées leur processus de croissance; la teneur en RNA (et protéines) endogène est faible. Le pourcentage d'eau dans ces tissus est supérieur à celui trouvé dans les tissus jeunes; il atteint une limite supérieure caractéristique des cellules ayant terminé leur élongation.
- L'élongation relative mesurée en un point de l'axe varie en fonction inverse de la distance séparant ce point de l'apex. Le taux en RNA (et protéines) suit la même évolution que l'élongation.

TABLEAU 6

EVOLUTION DE LA TENEUR EN PROTEINE DES DIFFERENTS SEGMENTS AU COURS DE LEUR CROISSANCE (22 Hr)

Le taux en protéines est rapporté au nombre de segments (A), au poids frais (B) et au poids sec (C). Les variations relatives par rapport au taux initial, sont exprimées en % et désignées par % Pr.

	Segment	PROTEINES INITIALES	PROTEINES FINALES	% Pr.
		ug/25 segments		
A	S'_0	2,652	3,175	(+19,7)
	S_0	3,707	4,505	(+21,5)
	S_2	2,282	2,703	(+18,4)
	S_3	1,974	2,266	(+14,8)
	S_8	1,185	1,301	(+ 9,8)
	S_{13}.....	1,262	1,370	(+ 8,5)
		mg/g PF		
B	S'_0	20,180	24,162	
	S_0	15,649	19,017	
	S_2	8,172	9,678	
	S_3	7,189	8,251	
	S_8	4,166	4,576	
	S_{13}.....	3,954	4,293	
		mg/g PS		
C	S'_0	209,5	250,7	
	S_0	183,7	223,2	
	S_2	121,3	143,6	
	S_3	114,0	130,9	
	S_8	78,6	86,4	
	S_{13}.....	74,6	81,0	

3. Effet de l'AIA "in vivo" sur les segments excisés

Les tissus végétaux excisés traités par l'AIA exogène ont une réponse qui dépend de leur nature et de la concentration en auxines endogènes (GALSTON et DAVIES, 1970). Cette dépendance apparait clairement lorsqu'on reporte l'effet produit par l'AIA (p.ex. sur l'élongation) en fonction de sa concentration externe. L'augmentation progressive du taux d'AIA se traduit d'abord par une stimulation du processus mesuré; son amplitude atteint un point maximum au-delà duquel l'AIA exerce un effet inhibiteur rapide. L'optimum correspond à des concentrations d'AIA différentes selon l'organe traité (THIMANN, 1937); pour les sections de tige (Pisum, Avena), il est de 10^{-5}M environ; pour les racines, de 10^{-10} à 10^{-11}M; enfin, pour les bourgeons, les valeurs sont intermédiaires. Pratiquement, la corrélation existante entre l'effet de l'AIA et sa concentration externe est à la base des tests physiologiques sensibles mis au point (PILET, 1961) pour le dosage des auxines.

Les sections de tige de Pois traitées par l'AIA répondent par une augmentation de l'élongation. Les tissus étiolés sont plus sensibles que les tissus verts et ont été largement utilisés dans les bio-tests auxiniques (GALSTON et HAND, 1949; GALSTON et BAKER, 1953). Une étude critique de PURVES et HILLMAN (1958) montre que l'emplacement des segment excisés sur l'épicotyle (il s'agit de Pisum sativum L., var. Alaska- différente des nôtres par une croissance plus rapide- 3 ème entre-nœud), et leur distance à l'apex influencent fortement la stimulation d'élongation induite par un traitement auxinique. Ce fait était à contrôler pour notre propre matériel car il permettait d'établir, bien qu'indirectement, un parallèle entre l'élongation, le taux en RNA et la teneur en auxines endogènes.

3.1 Méthodes

L'étude a porté sur les segments S_0, S_3, S_5, S_8 et S_{10}, de 5 mm de longueur et définis selon les conventions établies sous 2.(même chapitre). Au temps t_o, ces segments sont excisés, puis lavé dans du tampon phosphate 0,02 M; pH 6,1. On les dépose dans 5 ml du tampon précédent contenant en plus 2 % de saccharose. Pour le traitement auxinique, on ajoute au milieu de l'acide indole-3-acétique (MERCK), à la concentration finale de 10^{-6} ou 10^{-5}M. La croissance s'effectue dans un bain thermostaté (25°C± 0,2°C), sous agitation constante (ROTAX), à l'obscurité ou sous lumière verte (l'AIA est photosensible). Pour chaque essai, on utilise 2 lots de 20 sections chacun. Après 22 hr d'incubation (t_{22}), on photogra - phie les sections puis on mesure leur longueur finale (voir chapitre II).

3.2 Résultats

L'élongation absolue des segments excisés ou "sections", traités ou non par l'AIA, est présentée dans la fig.12; sans auxine, les sections montrent une élongation endogène un peut moins importante que celle déterminée "in situ", mais qui lui reste proportionnelle. Il est évident que l'excision restreint la croissance endogène en bloquant le flux d'auxines synthétisées dans l'apex, en permettant une diffusion partielle des substances de croissance endogènes ou en libérant des enzymes actives, impliquées dans la dégra - dation du RNA ou des phytohormones (RNases, AIA-oxydases). L'effet de l'AIA dépend de la position relative des segments sur l'axe épicotylaire; à la concentration de 10^{-6}M, la stimu - lation de l'élongation est généralisée, sauf pour la section S_{10} qui, par ailleurs, à une croissance endogène pratiquement nulle. A 10^{-5}M, l'auxine manifeste un effet positif, quoique

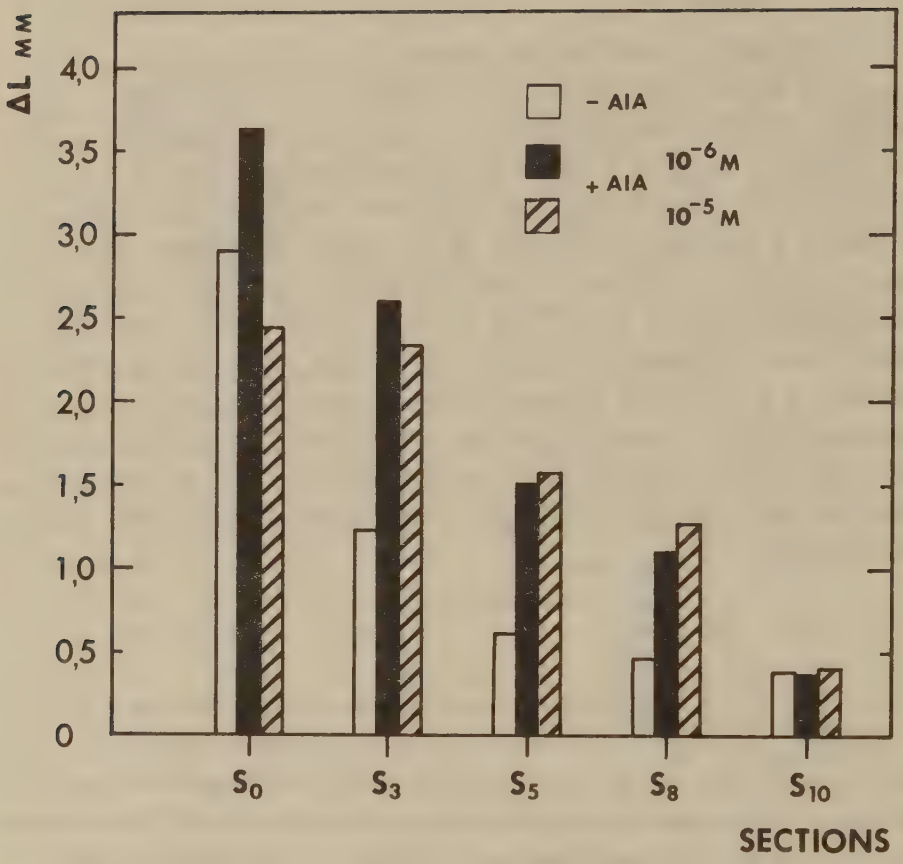


Fig. 12 - Elongation absolue (en mm) des sections, avec ou sans AIA
22 hr de traitement
Concentration finale en AIA: 1.10^{-5} et 10^{-6}M.

différent du précédent, mise à part la section S_0 dont l'élongation est partiellement inhibée. Le % de stimulation ou d'inhibition provoqué par l'AIA est indiqué dans le tableau 7. L'interprétation qui peut être donnée est la suivante: les sections proches de l'apex, composées de tissus jeunes, comme S_0, ont un taux d'auxines endogènes élevé, proche de l'optimum. L'apport exogène d'AIA ne peut produire qu'une légère stimulation de l'élongation ou une inhibition, pour des taux dépassant cet optimum (se référer au début du paragraphe 3.). Pour les sections plus éloignées de l'apex, la teneur en auxines endogènes diminue, au-dessous de cet optimum, ce qui se concrétise par une croissance limitée et une sensibilité accrue au traitement auxinique; encore faut-il que la paroi squelettique soit encore déformable, ce qui n'est pas le cas, p. ex., de la section S_{10}.

Ces expériences, confirmant celles de PURVES et HILLMAN (1958), montrent indirectement que le taux d'auxines endogènes est important (optimum) dans les premiers mm de tissus situés sous l'apex. Il diminue très rapidement vers la base de l'épicotyle, en fonction de la distance à cet apex.

4. Activité AIA-oxydase "in vitro"

Les études concernant le métabolisme auxinique, et plus spécialement le catabolisme, ont fait une large place aux processus de dégradation oxydative de l'AIA. Comme suggéré par PILET et GALSTON (1955), le taux de croissance est directement lié à la teneur en auxines endogènes; l'intervention de systèmes enzymatiques contrôlant la destruction de ces auxines présentait un intérêt évident en tant que facteur de régulation. Actuellement, l'existence et le rôle de ces systèmes enzymatiques ne sont plus contestés; ils ont fait l'objet de nombreuses publications et de mises au point dont les plus récentes sont

TABLEAU 7

EFFET DE L'AIA "IN VIVO" SUR LES SEGMENTS D'EPICOTYLE EXCISES

Le % d'effet relatif induit par l'AIA (concentration dans le milieu: 10^{-5} et 10^{-6} M) se calcule comme suit:

$$\% \text{ d'effet} = \Delta L\ (TR) - \Delta L\ (TE) / \Delta L\ (TE) \cdot 100$$

$$\text{ou} = L_f\ (TR) - L_f\ (TE) / L_f\ (TE) - L_i\ (TE) \cdot 100$$

avec TR: traités; TE: témoins; L_i: longueur initiale

L_f: longeur finale (après 22 hr d'incubation); ΔL: $L_f - L_i$

si le % d'effet est positif: stimulation
si le % d'effet est négatif: inhibition

SEGMENT	AIA 10^{-6} M	AIA 10^{-5}
S_0	+ 24,25	- 16,19
S_3	+ 113,00	+ 90,92
S_5	+ 158,04	+ 167,98
S_8	+ 138,02	+ 156,93
S_{10}	0	+ 1,27

celle de HARE (1964), de PILET (1965), de GASPAR (1965) et enfin la monographie de PILET et GASPAR (1968).

On parlera de systèmes auxines-oxydasiques pour désigner les complexes enzymatiques, de nature protéinique, qui catalysent la décarboxylation oxydative de l'AIA.

Bien que leur composition ne soit pas encore strictement définie, on admet maintenant la participation d'isoperoxydases (et celle, éventuelle, de polyphénols-oxydases). Le système semi-purifié n'est actif qu'en présence de cofacteurs; l'un serait de nature métallique (manganèse), l'autre monophénolique. Parmi ces monophénols, le 2,4 dichlorophénol (DCP) et l'acide p-coumarique (acpC) ont été largement utilisés.
Il est probable que les peroxydases oxydent l'ion Mn^{2+} en Mn^{3+} qui interviendrait dans des réactions complexes de transfert d'électrons. La réaction de décarboxylation impliquerait la formation de radicaux libres, avec la participation des mono - phénols comme accepteurs.
Les o-diphénols, les polyhydroxyphénols (p.ex. la quercétine ou l'acide chlorogénique) sont des inhibiteurs efficaces de l'activité AIA-oxydasique; ces diphénols, en donnant des radicaux quinoniques, pourraient entrer en compétition avec les radicaux libres de l'AIA (RCH_2 COO° ou R est le noyau indole) pour les sites de réaction. Les polyphénols-oxydases inter - viendraient dans la formation de complexes phénols-auxines ou quinones-auxines; indirectement, elles stimuleraient l'acti - vité auxines-oxydasique par oxydation des inhibiteurs naturels phénoliques.

Les auxines-oxydases, modulant la concentration endogène des auxines (ou des "Auxin-like-substances") contrôlent, mais indirectement, la croissance. En fait, une corrélation inverse entre l'activité des AIA-OX et le taux en auxines (ou la crois - sance) a souvent été démontrée; c'est le cas notamment des gradients exprimant, le long de la racine de Lens, la teneur en auxines et l'activité des AIA-OX (PILET et LANCE-NOUGAREDE, 1965). Sur des épicotyles de Pisum étiolés, dans la portion subapicale du 3 ème entre-nœud, l'activité des auxines-oxydases "in vivo" et "in vitro" et le potentiel de croissance sont en rapport inverse. Chez le Begonia evansiana, le développement de tubercules aériens requiert 2 à 3 jours courts (JC). Les peroxydases à activité AIA-OX deviennent plus actives après 2 JC; à leur maximum d'activité, le taux en auxines des

feuilles atteint son minimum. Si la durée des JC est encore réduite (24 hr d'obscurité), l'activité enzymatique présente un pic d'optimum qu'après 6 jours; c'est à ce moment, préci - sément, que le taux en auxines est le plus bas. Là aussi, indépendamment du rôle des auxines sur la formation des tubercules, la relation discutée plus haut est évidente.

4.1 Mesure de l'activité auxines-oxydasique

L'activité "in vitro" des auxines-oxydases est déterminée sur des segments d'épicotyle excisés prélevés à des distances croissantes de l'apex (plus précisément du point de référence 0). Il s'agit des segments S_0, S_3, S_8, S_{13} et S_{18}.

4.1.1 Extraits purifiés

25 sections de chaque type sont recueillies dans du tampon phosphate 0,02 M; pH 6,1 à 2°C, puis séchées sur un büchner. Les fragments sont rapidement congelés dans de l'azote liquide puis broyés et homogénéisés dans du tampon phosphate 0,066 M; pH 6,6 (8 ml). Après centrifugation (20 min; 13'000 x g; 2°C) et lavage du culot par 2 ml de tampon, suivi d'une nouvelle centrigugation, les surnageants sont collectés (10 ml). On procède alors à la précipitation des protéines par l'acétone (FRAGATA, 1967). On ajoute aux 10 ml d'extrait 20 ml d'acétone refroidi à -23°C (ce qui fait une solution à 66,6 % d'acétone). Après 24 hr à 0°C, on récolte le précipité par centrifugation (30 min; 18'000 x g; -10°C); on le lave par de l'acétone pur (4 ml), puis on le sèche sous vide; la poudre est conservée au congélateur (-23°C), dans un dessicateur. Au moment de la détermination de l'activité, l'extrait est suspendu dans 10 ml de tampon phosphate initial pendant 2 hr. Après centrifugation (20 min; 18'000 x g; 2°C), le surnageant, complété à 10 ml exactement, constitue la solution enzymatique.

4.1.2 Techniques de la mesure d'activité

a/ Principe: une quantité connue d'AIA est mise en contact avec un volume déterminé de solution enzymatique. Après 1 hr d'incubation (25°C), on mesure colorimétriquement la quantité d'AIA résiduel; on en déduit celle qui a été détruite enzymatiquement.

b/ Dosage de l'AIA: L'AIA, en présence de réactif de SALKOWSKI forme un complexe AIA-Fe^{3+} coloré. Le réactif utilisé est celui de PILET et CHOLLET (1970). Sa composition est la suivante:

- $FeCl_3.6\ H_2O$ (pro.Anal. Merck); 5 %: 200 ml
- H_2SO_4, 95-97 % (d=1,84); pro. Anal. Merck: 225,5 ml
- H_2O: 574,5 ml

La concentration dans le milieu final (4 ml de réactif et 1 ml de solution à doser correspond à: Fe^{3+} 3.10^{-2}M
H_2SO_4 6,5 N.

Après avoir mélangé rapidement (sur VORTEX) 1 ml de solution à doser et 1 ml de réactif, on laisse la coloration se développer pendant 1 hr exactement, à 21°C ± 0,2°C; on mesure alors la DO à 535 nm sur un KLETT-SUMMERSON (filtre n° 54). Une courbe standard est aussi réalisée avec de l'AIA (acide indole-3-acétique Merck) à différentes concentrations (fig.12).

c/ Incubation du substrat et de la solution enzymatique

Le milieu d'incubation contient:

- 1 ml d'AIA; concentration finale: 35 ug/ml
- 3 ml de tampon phosphate 0,066 M; pH 5,6 contenant ou pas les effecteurs suivants:
  Mn^{2+} (sous forme de $MnCl_2.4\ H_2O$ (pro. Anal. Merck) concentration finale dans le milieu: 2.10^{-5}M.
  Acide p-coumarique (acpC) puriss, Fluka; concentration finale dans le milieu: 1.10^{-5}M.
- 1 ml de solution enzymatique initie la réaction (temps 0).

Après 1 hr d'incubation (25°C ± 0,2°C-obscurité-agitation sur ROTAX), on prélève 1 ml de milieu sur lequel on dose l'AIA résiduel par le réactif de SALKOWSKI.

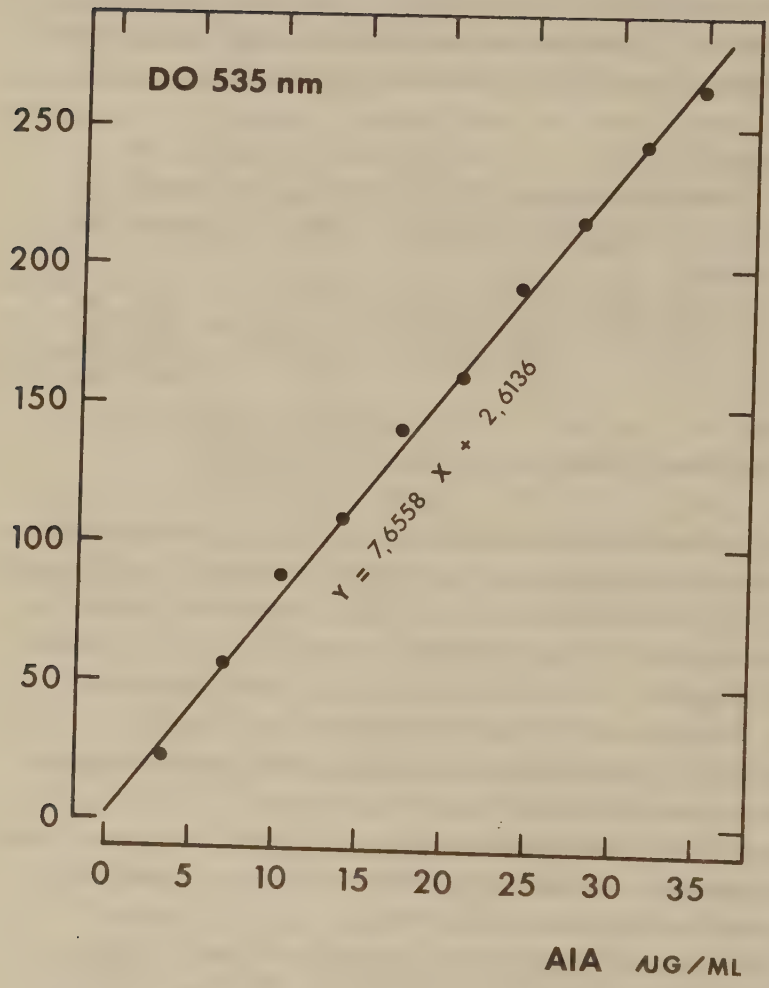


Fig. 13 - Courbe standard pour la détermination de l'AIA (Réaction de SALKOWSKI, modifiée par PILET et CHOLLET (1970)

d/ Taux en protéines des extraits: à 3 ml d'extrait enzymatique on ajoute 1 ml d'acide perchlorique (APC) 1,5 N, préalablement refroidi à 0°C. Pendant l'addtion de cet acide on maintient l'extrait à basse température (-6°C). Après 4 hr à 2°C, on centrifuge (20 min; 13'000 x g; 2°C). Le précipité est resuspendu dans 1 ml de NAOH 0,4 N pendant 18 hr, à température ambiante (environ 25°C). Après une nouvelle centrifugation, dans les conditions précédentes, une prise du surnageant résultant, convenablement dilué, sert à la détermination des protéines selon LOWRY et al. (1951).

4.2 Résultats et discussion

Les travaux de GALSTON et BAKER (1951) ont montré que des extraits auxines-oxydasiques de Pois étiolé détruisent plus efficacement l'AIA après dialyse. Ces mêmes extraits, mais préparés sur des Pois ayant poussé à la lumière, et non dialysés, ont une activité enzymatiques comparable à celle des extraits dialysés du premier cas. Pour ces auteurs, la lumière ou la dialyse élimine un inhibiteur naturel (probablement phénolique) des AIA-OX; c'est pour cette raison que nous avons préféré isoler de suite un extrait purifié; la comparaison de l'activité enzymatique des sections n'est, dans ce cas, pas influencée par les facteurs endogènes (effecteurs) probablement présents dans notre matériel et à des taux variables selon l'âge des tissus.

La fig.13 présente l'activité spécifique des auxines-oxydases pour les sections étudiées, en présence de Mn^{2+} et d'acpC. Les extraits n'ont aucune activité en l'absence des deux cofacteurs (ce qui était prévisible puisque nous avons procédé à une purification). La courbe d'activité des AIA-oxydases, par rapport à la position des sections sur l'axe épicotylaire, suggère les remarques suivantes:

- l'activité des oxydases augmentent lorsque la croissance

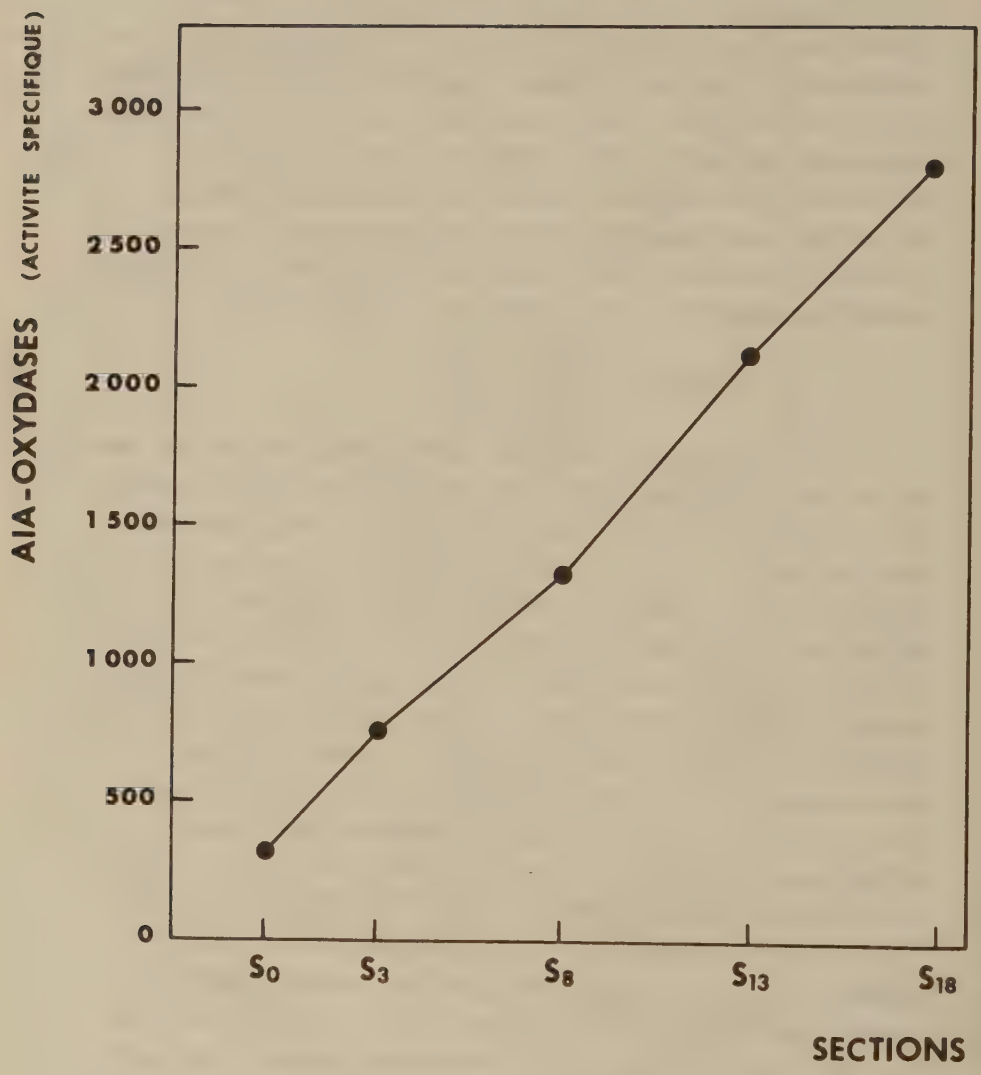


Fig. 14 - Activité spécifique des auxines-oxydases (en µg d'AIA détruit/mg protéine/hr) "in vitro", pour les divers sections d'épicotyle

endogène (ou la teneur en auxines) diminue. La corrélation est bien inverse, mais non stricte.

- on peut aussi dire, comme GALSTON et DALBERG (1954) ou PILET (1969 b), que l'accroissement de l'activité auxines-oxydasique est une caractéristique des tissus âgés et qu'il est concomitant à la perte du potentiel de croissance des cellules. Que les AIA-OX soient impliquées dans les mécanismes de régulation au niveau de l'état auxinique endogène est évident, mais celà n'explique pas certains faits. Par exemple, on peut voir dans la fig.14 que les sections S_{18} possèdent une activité AIA-oxydasique supérieure à celle des sections S_{13}. Or, ces deux sections correspondent à des tissus qui ont terminé leur croissance; les parois squelettiques ne sont plus extensibles et l'élongation cellulaire n'est plus stimulée par l'AIA. Pourquoi la présence de ces enzymes puisque leur substrat (l'AIA) n'est plus capable de modifier la croissance? Pourquoi cette modification d'activité entre les deux sections puisqu'un contrôle du taux en auxines ne se justifie plus?

A part les AIA-OX, d'autres mécanismes permettent de régler la concentration interne des auxines: l'AIA peut être sequestré sous forme de complexes (peptidique, glycosidique ou phénolique) ou immobilisé en se liant ("bound auxin") à des protéines (LEOPOLD, 1964). Le rôle physiologique de ces associations n'est pas toujours connu (réserve, détoxification, protection etc.; MORRIS et al., 1969).

5. Traitement par l'AIA "in situ"

5.1 Effet caractéristique induit par l'AIA "in situ"

L'application d'AIA "in situ", dans la région apicale de la tige de Pois (apex et zone d'élongation active), provoque pour certaines concentrations (doses supra-optimales, une réponse particulière de la partie traitée: il s'agit

d'une dilatation ou d'un gonflement ("swelling effect") des tissus visible après 24 hr environ depuis l'application de l'AIA. Il s'accompagne d'une augmentation du volume cellulaire, du poids frais et sec et provoque une inhibition de la croissance de la plantule (MAC QUARRIE, 1965). Ce processus entraîne des modifications morphologiques et physiologiques importantes: ainsi, alors que la croissance est normalement longitudinale pour les tissus subapicaux, dans le cas de cette dilatation elle est réorientée pour faire place à une expansion latérale; au niveau de la paroi squelettique, on note une altération de la biréfringence optique associée à une nouvelle orientation des microfibrilles de cellulose qui, d'abord transversales, se déposent ensuite longitudinalement (VEEN, 1970 a et b). La diminution de l'élongation qui s'ensuit paraît être l'effet et non la cause du gonflement; elle est probablement causée par une limitation de l'expansion cellulaire.
FAN et MACLACHLAN (1967) montrent que le "swelling effect" provoque une augmentation de l'activité des cellulases et du taux en RNA. RIDGE et OSBORNE (1969) précisent que les cellulases activées sont les CMC-cellulases solubles (c'est-à-dire des enzymes capables de dégrader la carboxyméthyle-cellulose) et les cellobiases.
Cet effet particulier de l'AIA sur la croissance subapicale des tiges pourrait impliquer la participation de l'éthylène, considé - ré par certains auteurs comme une véritable hormone végétale, impliquée comme les autres dans la régulation de la croissance (LEOPOLD, 1971).

5.2 Expériences réalisées

5.2.1 Plantule intacte: effets qualitatifs induits par l'application d'AIA

Il s'agissait, en fait, de voir si l'application d'AIA près de l'apex provoquait la réaction de gonflement sur notre matériel et, si c'était le cas, la concentration minimale

d'auxine causant cet effet. Pratiquement, on délimite sur les épicotyles, au temps 0, les segments S'_0, S_3 et S_8 (voir fig.9 de ce chapitre). On applique autour du segment S'_0 un anneau de lanoline plus ou moins enrichie en AIA (fig.15A).

Préparation du mélange lanoline-AIA (PILET, 1961): une quantité déterminée d'AIA (dépendante de la concentration finale désirée) est solubilisée dans 10 ml de diéthyl éther (Fluka, puriss.), puis la solution est complétée à 50 ml par ce même solvant. 1 ml de cette solution est mélangé intimement à 2 g de lanoline anhydre, préalablement liquéfiée dans un bain d'eau à 70°C. Après évaporation de l'éther résiduel, on conserve la pâte obtenue à l'abris de la lumière, à 2°C. Les anneaux de lanoline pèsent environ 5 mg et sont formés à l'aide d'une seringue spéciale.

Les plantules témoins reçoivent un anneau de lanoline préparé comme indiqué, mais sans AIA. Dans d'autres expériences, la lanoline enrichie a été placée soit au niveau du segment S_3, soit au niveau de S_8. Les plantules sont remises en culture.

5.2.2 Plantule décapitée: effets quantitatifs induits par l'AIA

On délimite sur les plantules, toujours au temps 0, un segment de 10 mm situé à 2 mm du point de référence 0. On décapite ces plantules (élimination des tissus situés au-dessus du point 0, donc de l'apex et de l'ébauche du premier noeud). On coiffe la surface de coupe par des manchons de polyvinyl souples (longueur 10 mm) dont le diamètre est exactement celui de la section des épicotyles; le tube est fendu longitudinalement pour éviter les contraintes lors de la croissance tissulaire. On dépose à l'intérieur un volume de lanoline correspondant à 5 mg et contenant 1 µg d'AIA. Comme précédemment, les témoins ne reçoivent que de la lanoline pure. Les plantules sont aussi remises en culture pour 22 hr. Après ce temps, on détermine la longueur du segment (10 mm à t_o), son poids frais ou sec, sa teneur en eau. Le RNA, le DNA et les protéines sont dosés également, au début (t_o) et à la fin (t_{22}) du traitement. La méthode d'extraction et de dosage du RNA et des protéines a été décrite dans le chapitre III (3. et 4.). Le DNA est

mesuré par la méthode colorimétrique de BURTON (1956), spécifique des désoxyriboses.

Dosage du DNA:- Extraction

Après l'extraction du RNA, il reste un culot P9 contenant le DNA et les protéines (voir fig.4, chapitre III); ce culot est repris par 3 ml d'acide perchlorique 0,5 N et l'homogénat chauffé à 70°C pendant 25 min. Après centrifugation (30 min; 18'000 x g), le résidu est lavé par 2 ml d'acide perchlorique de même normalité, puis centrifugé. Les deux surnageants collectés constituent la fraction DNA.

- Réaction de BURTON

Réactifs:

1. Diphénylamine- 1,5 g de diphénylamine (Fluka, puriss) solubilisés dans 100 ml d'acide acétique concentré. On ajoute encore 1,5 ml de H_2SO_4 concentré (97 %).
2. Solution d'acétaldéhyde- 2 ml d'acétaldéhyde (Merck p.a) diluée à 100 ml par de l'eau bidist.

Réactif de BURTON: mélange de 0,5 volumes de la solution d'acétaldéhyde à 100 volumes de diphénylamine (à préparer au moment de l'utilisation).

Dosage: 1 ml de solution de DNA, convenablement diluée, est mélangé sur un VORTEX à 2 ml du réactif de BURTON. Les blancs contiennent 1 ml d'APC 0,5 N à la place de la solution de DNA. On laisse la coloration se développer pendant 12 hr, à 2°C. L'absorbance est déterminée à 600 nm. Une courbe standard est aussi établie à partir de DNA commercial (Hareng) hydrolysé comme les extraits. (de 0 à 50 µg DNA/ml); on obtient une droite dont l'équation est:

$$Y = 0,0079\ X + 0,0029$$

corrélation: 0,9997

Cette méthode sensible est très spécifique du DNA; elle est la seule qui puisse donner des résultats corrects pour les végétaux.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Plantule intacte

L'application d'AIA (1 µg) autour du segment S'_0 provoque une dilatation caractéristique (fig.15 B) et une inhibition marquée de la croissance dans les tissus supérieurs; par contre, l'élongation du segment directement sous-jacent (S_3) est fortement stimulée (on notera une certaine augmenta - tion de l'épaisseur). Pour des concentrations d'AIA 10 fois supérieures, l'effet est pratiquement identique; il est encore visible pour des concentration bien inférieures, de l'ordre de 0,05 µg.

Si l'AIA (toujours 1 µg) est déposé maintenant au niveau du segment S_3, on constate que l'élongation de ce segment est encore stimulée, mais l'extension en largeur devient plus importante. Le segment inférieur S_B ne s'allonge que très faiblement. Par contre, l'élongation de S'_0 est encore inhibée, mais moins fortement que dans le premier cas; là aussi, on observe une forte expansion latérale. La zone de l'apex et de la courbure ne présentent toujours plus de croissance. Enfin, quant on place l'AIA autour du segment S_B, la croissance est normale pour toutes les régions.

On peut dire que l'effet de l'AIA, dans ces conditions, varie selon la position du point d'application, c'est-à-dire sa distance au méristème apical. La dilatation des tissus est d'autant plus importante que leur taux en auxines endogènes est élevé;l'inhibition de l'élongation s'explique par une élèvation de la teneur en auxines au-dessus de l'optimum (dose supra-optimale). La stimulation de croissance pour les segments éloignés de l'apex serait du à l'effet inverse. Enfin, comme l'indique MACQUARRIE (1965), l'application d'auxine peut perturber les mécanismes nutritionnels de la plantule et détouner certains nutriments vers le point d'application. Quant à l'implication de l'éthylène, son rôle sera discuté plus loin.

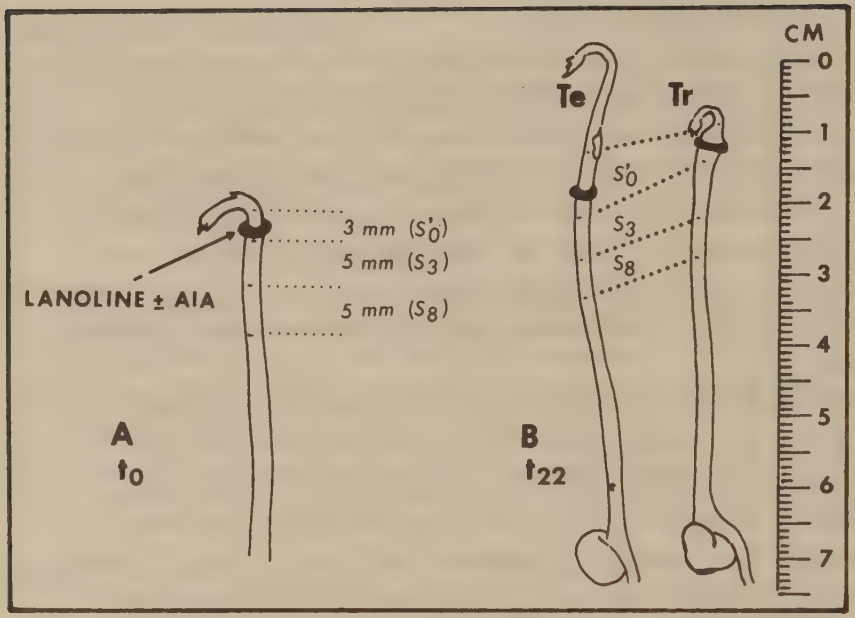


Fig. 15

TRAITEMENT "IN SITU" PAR L'AIA

A Application de lanoline enrichie en AIA, au temps t_0.

B L'épicotyle traité, après 22 hr de croissance.

à droite: traité
à gauche: témoin (lanoline sans AIA)

5.3.2 Plantules décapitées

L'application d'AIA sur la plantule décapitée (la lanoline contient 1 µg d'AIA) provoque, après 22 hr, un effet de dilatation comparable à celui qui se produit dans la plantule intacte (fig.16, A et B); le tableau 14 montre les variations physiologiques et biochimiques qui se pro - duisent sur le segment (10 mm) situé initialement à 2 mm de la surface de coupe.

L'élongation de ce segment, chez les lots traités, est légèrement stimulée; par contre, le poids frais et le poids sec sont considérablement augmentés. La teneur en eau est pratiquement identique à celle des témoins, ce qui indique que le gonflement des tissus n'est pas attribuable à une augmentation de la pression osmotique. L'auxine provoque aussi une synthèse importante du RNA et des protéines; elle induit des divisions cellulaires mises en évidence par une teneur accrue en DNA, qui par ailleurs reste stable au cours de la croissance des témoins. Ces observations confirment celles de FAN et MACLACHLAN (1967) pour des expériences simi - laires.

L'éthylène a été impliqué dans ces réactions de "swelling", car il produit un effet identique, à des doses aussi basses que 1 p.p.m; de plus il provoque une déviation de la croissance longitudinale vers une expansion latérale en inhibant l'élon - gation des tissus. Au niveau de la paroi cellulaire, les microfibrilles de cellulose s'orientent parallèlement à l'axe, comme dans le cas de traitement par l'AIA à forte concentration (BURG et BURG, 1968; APELBAUM et BURG, 1972). D'autres substances (benzymidazole, benzyladénine ou colchicine) sont susceptibles de dilater les tissus et de modifier la structure de la paroi. L'éthylène est synthétisé dans de nombreux tissus, et plus particulièrement dans ceux qui ont une croissance rapide (donc riches en auxines). Par ailleurs, l'AIA stimule la formation de ce gaz (BURG et BURG, 1968). L'AIA (dose supre optimale),

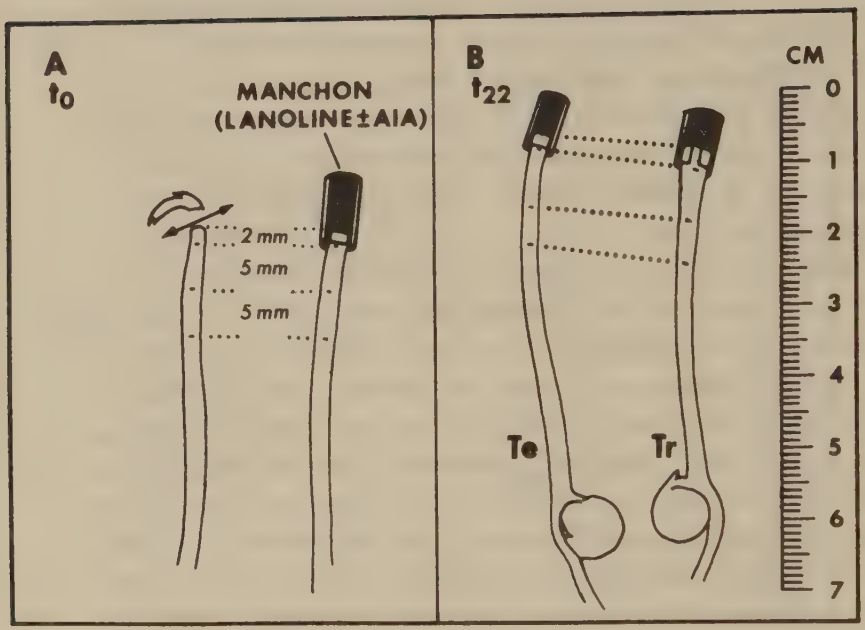


Fig. 16

TRAITEMENT "IN SITU" PAR L'AIA

A Application d'AIA sur l'épicotyle décapité (manchon rempli de lanoline) Temps t_0.

B Le même épicotyle après 22 hr de croissance.

à droite: traité
à gauche: témoin (lanoline sans AIA).

TABLEAU 14

EFFETS "IN SITU" DU TRAITEMENT PAR L'AIA SUR DES EPICOTYLES DECAPITES

Les critères de croissance sont mesurés après 22 hr de traitement; L: longueur des sections; PF et PS: poids frais et poids sec; % H_2O: g d'H_2O/100 g PF; les essais ont été réalisés sur 2 lots de 20 sections chacun par traitement.

VALEUR		L mm	PF mg	PS mg	% H_2O
INITIALE		10	521	-	-
FINALE (22hr)	- AIA	13,07	823	61,0	92,8
	+ AIA	13,80	1'170	87,4	92,5

VALEUR*		RNA µg	DNA µg	Protéine mg
INITIALE		349	37,1	3,810
FINALE (22hr)	- AIA	386	38,8	4,069
	+ AIA	547	47,5	4,635

* Les valeurs sont données pour 20 sections.

l'éthylène et les substances citées plus hauts inhibent l'incorporation de proline marquée dans une fraction protéinique associée à la paroi. Il est donc possible que le processus de dilatation des tissus induit par l'AIA soit en fait une réaction secondaire provoquée par l'éthylène; par contre, les autres manifestations induites par l'auxine n'ont aucune relation avec ce gaz. En effet, ce-dernier inhibe l'activité des cellulases (RIDGE et OSBORNE, 1969), ne semble pas activer la synthèse du RNA (EISENGER et BURG, 1972), ne provoque pas d'augmentation importante de poids frais et n'a aucune action sur les divisions cellulaires.

6. Conclusion

La région subapicale de l'épicotyle de Pois est caractérisée par des tissus en phase d'élongation stricte. La croissance endogène diminue rapidement de l'apex vers la base. Le taux en RNA mesuré le long de cette zone décroit de façon similaire. Des traitement "in vivo" par l'AIA montrent que la stimulation d'élongation, induite par l'auxine, augmente rapidement lorsque les tissus traités sont prélevés à des distances croissantes de l'apex. On peut en déduire que les auxines endogènes actives sont à un taux important sous l'apex (qui est d'ailleur leur site de synthèse). Leur teneur diminue rapidement dans les tissus situés plus bas. Parallèlement, l'activité des auxines-oxydases (enzymes du catabolisme auxinique), mesurée "in vitro", montre une progression croissante de l'apex à la base. On peut dire qu'il existe dans cette zone d'élongation un rapport directe entre la croissance, l'état auxinique endogène et la teneur en acide ribonucléique. Les travaux de MORRIS et al. (1969) et de MUIR (1972) étudiant d'une part, le transport et le métabolisme de l'acide indole-3-acétique marqué (au carbone 14, en C_1 ou C_2) sur des plantules intactes de Pois, ou d'autre part sa disparition sous forme de conjugués peptidiques ou de

complexes protéiniques, corroborent les résultats obtenus sur notre matériel. L'AIA synthétisé dans l'apex est rapidement transporté basipétalement, sous forme d'onde large dont l'amplitude diminue progressivement. On observe en même temps l'accumulation d'indole-3-acétyl aspartate (pour les plantules éclairées), de complexes AIA-protéines et des produits de dégradation (comme l'indole-3-acétaldéhyde et des composés non identifiés). L'AIA "diffusible" restant peut atteindre les racines latérales, mais ne pénètre pas dans les cotylédons ni dans les stipules de feuille. Les variations quantitatives globales du métabolisme de l'AIA , observées par MORRIS (1969), explique le gradient d'auxines endogènes que nous avons, indirectement, retrouvé.

C H A P I T R E V

ELONGATION ET BIOSYNTHESE DU RNA: EFFETS INDUITS PAR L'ACIDE INDOLE-3-ACETIQUE

1. Introduction

L'élucidation récente des mécanismes biochimiques de base, comme la synthèse des macromolécules (DNA, RNA, protéines) et une meilleure connaissance de leur aspect au niveau moléculaire ont influencé certains domaines de recherches dans les Sciences biologiques, la physiologie végétale entre autres. Il était alors logique de rechercher des interactions possibles entre l'action des phytohormones sur les cellules et l'une des séquences primaires conduisant du matériel génétique à la synthèse des protéines et des enzymes (transcription et traduction), modulée par des systèmes régulateurs, comme ceux proposés par JACOB et MONOD (1961). Nous ne considererons que les dérivés indoliques (ou substances apparentées) bien que d'autres effecteurs de croissance (gibbéréllines et kinétines) soient aussi impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques (LESHEM, 1973).

SILBERGER et SKOOG (1957) ont montré les premiers qu'il

existait une relation entre l'effet stimulateur de l'AIA sur la croissance de tissus de moelle de Tabac et la synthèse des acides nucléiques. Depuis, les centaines de travaux consacrés à ce sujet n'ont fait que préciser cette participation des auxines à certains aspects du métabolisme des acides nucléiques, et plus particulièrement à celui des RNA.

L'utilisation d'antimétabolites (analogues structuraux ou antibiotiques) a permis de connaître la nature du RNA probable - ment impliqué dans la croissance.

La 5-Fluoro uracile (5-FU), contrairement aux autres analogues de bases (comme la 8-azaguanine ou la 6-méthyl purine) ne supprime pas l'élongation endogène d'hypocotyle ou de racine de Soja (KEY et al., 1967; LIN et KEY, 1968); par contre, la majorité du RNA n'est plus synthétisée. Le RNA ribosomal (r-RNA) est inhibé à 90 %, le RNA soluble (s- ou t-RNA) à 75 %. Une seule fraction n'est pratiquement pas modifiée: il s'agit du D-RNA, reconnu comme appartenant aux diverses espèces de RNA messager (m-RNA). Lorsque ces mêmes tissus sont traités par la 5-FU et l'actinomycine D (connu pour bloquer la RNA-DNA dépendant polymérase, enzyme qui assure la synthèse du m-RNA- voir chapitre VI), l'élongation est stoppée, mais en plus la synthèse de tous les types de RNA l'est aussi (y compris celle du m-RNA). Il y a donc une étroite corrélation entre l'élongation continue et la synthèse du m-RNA.

"in vivo" le taux en auxines endogènes contrôle celui du RNA (MASUDA et WADA, 1966; PILET et BRAUN, 1967; TRUELSEN, 1967) en stimulant sa synthèse ou en ralentissant sa dégradation. L'apport exogène d'auxines, à des doses stimulant la croissance provoque une nette accumulation de RNA (ROYCHOUDHURY et SEN, 1964; HAMILTON et al., 1965; PILET, 1970). A long terme, le RNA formé serait surtout du r-RNA ou du s-RNA; à court terme, la stimulation auxinique concernerait plutôt le m-RNA ou les frac - tions hétérogènes de RNA riches en ATP (D-RNA ou T.B. RNA) qui auraient les propriétés de ce RNA particulier (MASUDA et TANIMOTO, 1967; KEY et INGLE, 1968; TANIMOTO et MASUDA, 1969). Enfin, les auxines naturelles (AIA) ou synthétiques (2,4 D) seraient susceptibles de stimuler l'activité de la RNA-polymérase

associée à la chromatine, soit directement (O'BRIEN et al., 1968), soit par l'intermédiaire d'un facteur libéré du plas - malemme (libération provoquée par ces auxines; HARDIN et al., 1972). Enfin, MONDAL et al. (1972) ont montré que l'AIA pouvait former un complexe avec un récepteur protéinique isolé du nucléoplasme. Ce complexe se fixe à un site particulier du DNA. La RNA-polymérase et un facteur d'initiation (indispensable pour l'activité de l'enzyme) viennent s'y associer: une nouvelle espèce de RNA est alors synthétisée. MATHYSSE et PHILLIPS (1969) avaient déjà envisagé une certaine dérépression du génome car la chromatine isolée de cellules traitées par les auxines a une activité de matrice plus importante que celle des cellules témoins.

La synthèse du RNA est modifiée par les auxines mais son catabolisme, sous l'action des RNases, l'est également. Ainsi, TRUELSEN (1967) constate qu'un traitement par l'AIA à des concentrations stimulant la croissance provoque une augmentation de la synthèse du RNA et une diminution de l'activité des RNases. S'il neutralise l'effet stimulateur de l'AIA par du p-chloromer - curibenzoate, la croissance diminue et l'inhibition des RNases par l'auxine est levée. PILET(1969a) compare l'action d'une RNase pancréatique, de l'AIA, ou des 2 substances combinées, sur l'élongation de racine ou d'épicotyle de Lens: la RNase seule réduit légèrement l'élongation; elle diminue l'effet stimulateur de l'AIA. Par contre, si l'auxine, à doses supra-optimales, inhibe la croissance, l'enzyme lève cette inhibition. De plus, il existe une bonne corrélation entre la teneur en auxines endogènes et en RNA, et une relation inverse entre le taux de ces substances et l'activité RNasique, dans des tissus de racine de Lens. Dans les cellules sénescence la diminution des auxines entraîne une activation des RNases et une chute concomitante du RNA (SACHER, 1963; PILET, 1969b).

Expériences réalisées

Le but de ces expériences est le suivant:
Déterminer deux types de segment d'épicotyle caractérisés par des tissus physiologiquement et biochimiquement diffé - rents.
Traiter les tissus excisés par une même concentration d'AIA exogène. Comparer l'effet de l'auxine sur la croissance (mesurée par l'élongation) et sur la biosynthèse du RNA (donnée par le taux d'incorporation d'un précurseur marqué: l'uridine-^{14}C).

Dans une seconde partie, le RNA marqué est purifié et les nucléotides constitutifs séparés par chromatographie; la répartition de la radioactivité peut donner des renseignements utiles sur le processus d'incorporation, tant du point de vue quantitatif que qualitatif.

2. Synthèse du RNA dans des sections d'épicotyle dont l'élongation est stimulée ou non par l'acide indole-3-acétique

2.1 Matériel et méthodes.

2.1.1 Choix des sections.

Avant d'aborder le problème du choix des sections proprement dit, il convient de rappeler que deux types d'essai peuvent être envisagés: l'un sur la plantule intacte ou "in situ", l'autre sur une portion excisée de la plante et maintenue dans un milieu artificiel ou "in vivo". Pour le genre d'expérimentation que nous voulions réaliser le second type était plus particulièrement indiqué; en effet, l'application de substances actives (composés auxiniques ou précurseurs marqués) "in situ" pose des problèmes particuliers:

- la substance ne peut être appliquée que très localement (exemple: quelques microlitres d'AIA en solution organique sont placées entre les stipules des feuilles recouvrant le méristème apical; on peut aussi former un anneau de lanoline enrichi en AIA et le placer autour de la zone à traiter).
- sa concentration ne peut pas être connue immédiatement, car le transport (ou la diffusion) entraînent cette substance dans des tissus différents où elle sera transformée et catabolisée de façon particulière. Enfin, les facteurs endogènes, transportés eux aussi, produisent des effets annexes en modifiant l'état physiologique des tissus.

"In vivo", par contre, le fragment prélevé ne subit plus l'influence des tissus environnants. Dans le milieu clos où on le maintient (milieu liquide ou solide), l'adjonction de substances actives est facilitée: homogénéité, concentration connue; "uptake", exodiffusion facilement mesurables.

Le traitement "in vivo" présente aussi quelques aspects négatifs: l'excision provoque des traumatismes pouvant perturber le métabolisme cellulaire ou libérer, du moins à la surface de coupe, des systèmes enzymatiques (AIA-oxydases-RNases , par exemple). Le milieu de survie doit être oxygéné et contenir une source adéquate de substances nutritives (carbone). Cependant, même dans des conditions parfaites, la durée de vie des tissus est limitée.

Concernant le choix des sections les problèmes étaient les suivants: déterminer deux types de section caractérisés par une croissance endogène mesurable, une stimulation de l'élongation lors d'un traitement par l'AIA mais dont l'amplitude soit quantitativement très différente dans les deux cas. En nous basant sur les résultats obtenus (voir chapitre IV), nous avons sélectionner les section S_0 et S_3. Leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques ont été résumées dans le tableau 15.

La section S_0, comparée à la S_3, possède une croissance endogène (sur 22 heures) nettement plus élevée, sur la base des trois critères principaux: variations relatives de l'élongation, du poids frais et du poids sec; quant à sa teneur initiale en RNA et protéines, elle est pratiquement deux fois plus importante. Il est évident que la section S_0 possède une concentration interne en composés auxiniques proche de la concentration optimale puisqu'un traitement par une solution d'AIA 10^{-5}M provoque une inhibition de l'élongation tandis qu'à 10^{-6}M on observe une très légère stimulation. La section S_3, par opposition, a une croissance endogène réduite. De ce fait, l'AIA est un effecteur nettement positif de l'élongation, pour les deux concentrations mentionnées plus haut. Inversément, on a montré (chapitre IV) que S_0 est caractérisé par une faible activité auxine-oxydasique, nettement inférieure à celle de S_3.

TABLEAU 15

CROISSANCE COMPAREE DES SECTIONS S_0 ET S_3

(Critères physiologiques et biochimiques)

Critères de référence*			S_0	S_3
CROISSANCE "in situ" (22hr)	%L		226	45
	%PF		323	58
	%PS		170	46
	RNA	µg/25 sect.	597	290
		mg/g PF	2,521	1,057
	Protéines	mg/25 sect.	3,707	1,954
		mg/g PF	15,649	7,189
ELONGATION "in vivo" Traitement par l'AIA	AIA 10^{-5}M	$\%L_{AIA}$	-16,19	+113,00
	AIA 10^{-6}M		+24,25	+ 90,92

*

%L, %PF et %PS: variations relatives=(valeur i-valeur f/valeur i).100

Les valeurs données pour le RNA et les protéines sont les valeurs initiales (t_o).

$\%L_{AIA}$: % de stimulation (ou d'inhibition) calculé comme suit:

$$\%L_{AIA} = Lf(TE)-Lf(TR)/Lf(TE)-Li(TE) .100$$

avec TE:témoin
TR:traité
Lf et Li: longueur finale et initiale.

2.1.2 Cinétique de l'élongation induite par l'AIA.

30 sections de chaque sorte (S_0 et S_3) fraîchement excisées sont déposées dans 200 ml de tampon phosphate (Na_2HPO_4-KH_2PO_4) 0,02 M, pH 6,10 puis lavées par ce tampon. On les place dans des fioles de 5 ml contenant 3 ml de tampon phosphate, 2 % de saccharose et, dans le cas d'un traitement auxinique, de l'AIA à la concentration finale de 10^{-6}M. L'incubation (7 heures) se réalise à l'obscurité, à une température de 25°C ± 0,2°C et sous agitation (75 oscillations/min sur un ROTAX). L'élongation moyenne des lots témoins ou traités par l'AIA est mesurée toutes les heures selon la technique photographique décrite dans le chapitre II.

2.2 Marquage du RNA par l'uridine 2-^{14}C et mesure de la radioactivité.

2.2.1 Incorporation de l'uridine marquée.

Pour chaque essais on utilise 2 lots de 30 sections (S_0 ou S_3) chacun. Le milieu est identique à celui décrit ci-dessus (2.1.2) avec ou sans AIA; dans tous les cas on y incorpore 1 µCi/ml d'uridine 2-^{14}C (activité spécifique: 62 mCi/mMole) fournie par AMERSHAM. Les conditions externes (obscurité, agitation et température) sont également indiquées dans le paragraphe précédent.

Après 3 hr d'incubation, les sections sont rapidement placées sur un büchner, lavées sous l'eau courante (5 min), plongées dans 200 ml de tampon phosphate à 0°C et agitées en continue pendant 1 hr ; ce traitement à basse température bloque le transport actif et le métabolisme mais perment l'élimination par diffusion passive de l'uridine non incorporée. Les sections sont ensuite superficiellement séchées entre deux papiers-filtres et pesées; après congélation (-40°C) on les lyophilise pendant 24 hr.

2.2.2 Détermination de la radioactivité incorporée totale ou au niveau du RNA.

a/ Incorporation totale: la radioactivité se mesure par la technique de scintillation liquide sur un NUCLEAR CHICAGO MARK 1. 5 sections de chaque lot sont déposées dans un flacon à scintillation, broyées et homogénéisées dans 1 ou 2 ml de méthanol qu'on évapore ensuite sous vide. On ajoute à chacun des flacons 10 ml du mélange scintillant suivant: omnifluor (98 % de PPO + 2 % de bis MSB)-éthanol-toluène dans un rapport de 0,4 g: 250 ml: 750 ml. Les coups par minute (cpm) donnés après correction du bruit de fond et du "quenching" (standardisation externe) sont transformés en désintégrations par minute (dpm) après calcul du rendement (de l'ordre de 80 %).

b/ Incorporation dans le RNA: les 25 sections restantes sont réduites en poudre en présence d'azote liquide et le RNA extrait comme précédemment (chapitre III.3). On évalue son taux par spectrophotométrie uv (différence d'absorption à 260 et 290 nm); pour déterminer l'incorporation de l'uridine 2-^{14}C on introduit 200 µl de la fraction RNA neutralisée à pH 7,0 dans 10 ml de mélange scintillant. Les dpm reçus se calculent comme ci-dessus.

3. Résultats expérimentaux.

3.1 Cinétique de l'élongation.

Les variations de l'élongation au cours du temps pour les sections S_o et S_3 (avec ou sans traitement par l'AIA) sont représentées dans la fig.17. Les courbes obtenues suggèrent les commentaires suivants:

- L'élongation endogène des sections S_o est plus importante que celle des sections S_3; après 7 heures de culture

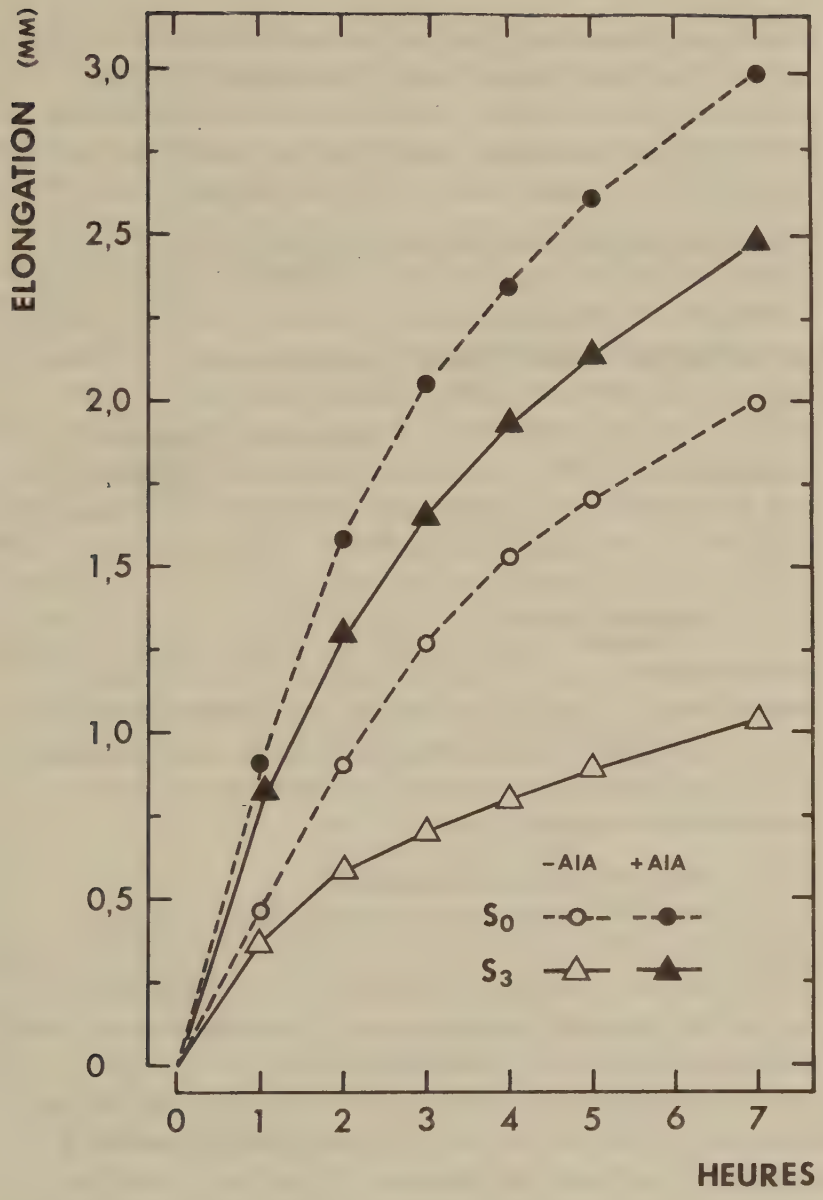


Fig. 17 - Evolution de l'élongation (en mm) des sections d'épicotyle (S_0 et S_3), traitées ou non par l'AIA, au cours du temps.
Concentration en AIA: 10^{-6}M.

les valeurs relatives (%L) sont respectivement de 50% et de 21%. Comparées aux taux d'élongation "in situ" (tableau 15), il apparait que S_o n'a exprimé que le quart environ de son potentiel maximum de croissance au cours de ces 7 heures alors que S_3 est à la moitié du sien.

-Effets du traitement auxinique (AIA 10^{-6}M): pour les 2 types de section l'AIA a un effet stimulateur net; cependant, ce processus présente des différences d'ordre quantitatif importantes: ainsi, alors que la stimulation pour S_o est de 56,8% après 3 heures, elle est de 170% pour S_3, ce qui représente une induction 3 fois plus importante. L'allure des courbes cinétiques montre encore que l'AIA exerce son action très rapidement, probablement déjà dès les 20 premières minutes.

3.2 Synthèse du RNA.

Nous étudierons les variations du taux en RNA au cours des traitements d'après les données spectrométriques, puis sur la base de l'incorporation du précurseur marqué; Enfin, nous tenterons d'établir une corrélation entre élongation et synthèse du RNA.

3.2.1 Mesures spectrophotométriques.

Tous les résultats obtenus figurent dans le tableau 16.

Initialement (to) les sections S_o contiennent 2,27 fois plus de RNA que les sections S_3; ce rapport est pratiquement le même pour ces segments "in situ" (voir tableau 15).

Sans traitement auxinique (lots témoins), on constate qu'après 3 hr de culture le taux en RNA diminue légèrement:(-13%) dans les sections S_o;(-5%) dans les sections S_3. Ce fait n'est pas surprenant puisqu'il est connu (KEY et SHANNON, 1964; FLETCHER et OSBORNE, 1965) que le RNA décroit dans des tissus végétaux excisés et cultivés pendant quelques heures en milieu liquide.

L'AIA, dans les deux cas, influence la biosynthèse du RNA; pour S_o, l'effet positif de l'auxine modère la baisse de la teneur en cet acide ribonucléique observée chez les témoins, mais le taux final reste inférieur à sa valeur initiale (-9%). Pour S_3, la stimulation induite par l'AIA est assez élevée non seulement pour compenser la perte de RNA consécutive à l'excision mais encore pour que la variation résultante soit positive (+29%).

3.2.2 Incorporation de l'uridine 2-^{14}C au niveau du RNA.

Les résultats discutés sont présentés dans le tableau 16.

a/ "uptake": l'incorporation totale (dpm/25 sections) est à peu près la même pour les sections S_o et S_3, avec ou sans AIA; on peut cependant discerner une légère inhibition sur la perméabilité cellulaire chez les lots traités. Le % d'incorporation calculé sur la base de la radioactivité fournie (soit 4'605'320 dpm) à les valeurs suivantes:

Sections	Traitement	% d'incorporation*
S_o	- AIA	5,11
	+ AIA	4,73 (-0,38)
S_3	- AIA	5,97
	+ AIA	5,38 (-0,69)

* % incorporation: (dpm fournies/dpm totaux des sections)x100

le taux d'incorporation est comparable à celui trouvé par ROSS, 1965 sur des disques de feuilles de Phaseolus vulgaris marqués par de l'uridine 2-^{14}C (temps de contact: 4 hr).

b/ incorporation dans le RNA

- sections non traitées: comparons tout d'abord la radioactivité des sections S_o et S_3 non soumises à l'AIA et après 3 heures d'incubation (RNA dpm/25 sections): nous constatons que l'incorporation d'uridine marquée est 1,99 fois plus

TABLEAU 16

SYNTHESE DU RNA MESUREE PAR L'INCORPORATION D'URIDINE 2-^{14}C

SECTION	TRAITEMENTS	TEMPS H.	RNA µG/25 sections	RNA MG/G PF	INCORPORATION * Δ Totale DPM	INCORPORATION * Δ RNA DPM	ACTIVITE SPECIFIQUE DPM/µG RNA	% DPM RNA / DPM totales
S_0	-	0	642 ± 8,3	2,097	-	-	-	-
	-AIA	3	559 7,8	1,827	235'630	15'270 ± 520	27,32	6,48
	+AIA	3	579 11,6	1,890	217'970	17'143 680	30,27	7,86
S_3	-	0	282 5,1	0,928	-	-	-	-
	-AIA	3	267 5,6	0,877	275'390	17'688 295	28,79	2,79
	+AIA	3	363 17,2	0,194	247'780	11'108 470	30,60	4,48

* pour 25 sections .

Δ radioactivité fournie : 4'605'320 dpm

intense dans le RNA des sections S_0 que dans celui des sections S_3. Pour tenir compte des différences "d'uptake", on peut exprimer le pour-cent de radioactivité du RNA par rapport à la radioactivité totale incorporée (100 x dpm RNA/dpm totales). Les valeurs déterminées pour S_0 et S_3 sont respectivement de 6,48 et de 2,79 %. Sur cette base, on peut dire que S_0 incorpore 2,32 fois autant d'uridine dans son RNA que S_3. Ce résultat est tout à fait concordanr avec celui tiré des mesures spectrophotométriques (discutées sous 3.2.1) où il était montré que S_0 contenait 2,27 fois plus de RNA que S_3.

-sections traitées par l'AIA: comme pour l'élongation, l'AIA stimule la biosynthèse du RNA dans les deux types de section, mais c'est surtout sur les sections S_3 que son effet est le plus accentué. Comparons la radioactivité relative du RNA des traités par rapport à celle des témoins: elle est de 12,26% pour S_0 et de 44,5%. En tenant compte, comme plus haut, des différences d'absorption, c'est-à-dire en nous référant aux pour-cents de la radioactivité du RNA rapportée à la radioactivité totale incorporée, on voit que l'augmentation relative (en %) du rapport précédent (tableau 16, dernière colonne à droite) entre témoins et traités est de 21,3% pour S_0 et de 60,6% pour S_3. Il apparait alors que la stimulation de snthèse du RNA par l'AIA (à la même concentration exogène de 10^{-6}M) est 2,84 fois plus intense pour la section S_3 que pour la section S_0. D'autre part, on a constaté que la stimulation de l'élongation par l'AIA (en 3 hr) était 3 fois plus importante sur la section S_3 que sur la section S_0. Bien que la comparaison chiffrée entre un processus physiolo - gique (élongation) et un processus biochimique (synthèse de RNA) doit se faire avec prudence, la concordance des résultats est troublante. Cependant, le fait d'utiliser des valeurs relatives permet cette comparaion car elles ne décrivent que l'évolution des processus.

4. Répartition de la radioactivité au niveau des nucléotides monophosphate constitutifs du RNA.

Les nucléotides 2'+ 3' monophosphate libérés par hydrolyse du RNA marqué sont purifiés sur charbon actif, séparés sur couche mince échangeur d'ions et leur radioactivité analysée.

4.1 Séparation des nucléotides.

La séparation et la détermination quantitative des dérivés d'acides nucléiques (bases libres, nucléosides ou nucléotides) en très faible quantité s'effectue, le plus souvent, par la technique de chromatographie sur couche mince. Dans ce domaine, l'introduction d'échangeurs d'ions liés aux supports traditionnels permet d'augmenter de façon remarquable la finesse de résolution et la spécificité. Il suffit, par exemple, de modifier la charge ou la capacité de l'échangeur pour donner à la matrice qui le porte de nouvelles propriétés. Le choix du support et de l'échangeur sera fonction des caractéristiques physico-chimiques des composés devant être isolés.
Les nouveautés techniques dans ce domaine sont aussi dues, pour une grande part, à l'intérêt qu'ont suscité les dérivés puriques et pyrimidiques (DNA, RNA, coenzymes et facteurs énergétiques) quant à leurs rôles, de plus en plus important, dans les mécanismes biochimiques fondamentaux.

La couche mince présente des avantages certains: haute résolution et sensibilité, simplicité et surtout rapidité; par contre, les substances à isoler doivent être déjà partiel - lement purifiées. La chromatographie sur papier, la première utlisée (MARKHAM et SMITH, 1951), ne permet pas de séparer

convenablement les nucléotides libérés par hydrolyse du RNA. L'électrophorèse sur papier donne des résultats meilleurs mais nécessite un appareillage complexe et coûteux; de plus, la durée de migration est assez longue. Enfin, l'utilisation des colonnes échangeurs d'ions, comme les résines de type Dowex (COHN, 1957) ou d'autres polymères comme les DEAE-celluloses, permet une bonne séparation des dérivés nucléotidiques et de leurs isomères (par exemple, les formes 2', 3' et 5'-phosphate d'un même nucléoside), mais la quantité de substance nécessaire pour l'analyse reste nettement supérieure à celle qui est pratiquement employée pour la couche mince.

4.1.1 Celluloses échangeurs d'ions

Un des polymères organiques les plus communément utilisés en couche mince est la cellulose. Elle se trouve commercialisée sous deux formes:

- la cellulose microgranulaire où la majeure partie de la zone amorphe a été éliminée. Le reste comprend surtout des régions microcristallines dont la cohésion est renforcée par l'introduction de liaisons nouvelles crées chimiquement.

- la cellulose native, fibreuse, comme la NM 300 (Macherey, Nagel & Co., Düren, West-Germany) présente des chaînes de 2 à 20 microns résultant de la polymérisation d'unités de cellobiose (liaison glycosidique β, 1-4); le degré de polymérisation (DP) est de 400 à 500.

Sous forme de couche mince, ces celluloses permettent la séparation de composés hydrophiles: sucres, acides aminés et dérivés d'acides nucléiques. Comme pour la chromatographie sur papier, c'est le principe de partage qui régit la migration. Le caractère hydrophile de la cellulose est dû, en majeure parti, à la présence de groupes hydroxyles libres et de liaisons hydrogène internes ou externes. BOVÉ et YOT

(1965) l'utilisant en couche mince pour la séparation des quatre ribonucléosides monophosphate (0,02 micromoles) en une dimension n'obtiennent pas de séparation complète puisque l'UMP et le CMP, dont les Rf sont très proches, restent confondus.

Mais on peut aussi modifier chimiquement la structure de la cellulose et transformer son comportement; ainsi, son acétylation la rendra plus ou moins hydrophobe alors que l'introduction d'échangeurs d'ions renforcera son caractère hydrophile; dans ce dernier cas, le processus de partition essentiel pour la chromatographie sur cellulose non traitée est complété par l'apparition de forces d'échange qui peuvent devenir prépondérantes. Cependant, il faut noter que ces substitutions directes peuvent amener des changements pro - fonds des propriétés physico-chimiques de la cellulose, surtout si l'incorporation des nouveaux groupes est impor - tante; il en résulte une diminution des liaisons hydrogène, une perte de la configuration native entraînant un gonflement des particules et, éventuellement, une scission des chaînes qui se traduit macroscopiquement par une solubilisation partielle de ce polysaccharide. Pour limiter ce processus, il convient alors de procéder à une réticulation de la structure par introduction de ponts covalents; ceci n'est pas sans désavantage puisqu'on introduit un effet de tamis moléculaire qui augmente avec la densité de la réticulation.

L'échangeur d'ions est un polyélectrolyte caractérisé par son groupe actif ionisable et sa capacité d'échange (on l'exprime en milliéquivalents par gramme: méq./g). Il se substitue à certains groupements libres de la cellulose (comme les hydroxyles, par exemple) ou est adsorbé par des interactions probablement de nature ionique. Si les charges fixées sont positives, l'échangeur sera du type anionique;

dans le cas contraire, du type cationique. Parmi les dérivés les plus couramment utilisés on peut citer: la DEAE (diéthyl-aminoéthyle), la TEAE (triéthylaminoéthyle) et l'ECTEOLA (épichlorohydrine-triéthanolamine)- celluloses pour les échangeurs d'anions, et la CM (carboxyméthyle)- cellulose comme échangeur cationique.

Nous avons choisi un autre dérivé moins courant: la PEI-cellulose (polyéthylèneimine) préparée en traitant la cellulose "fibreuse" (RANDERATH, 1962) par une solution de polyéthylène - imine dont les longues chaînes, hautement chargées, de poly - amines (groupe actif: $[-CH_2-CH_2-NH_2]_x$) sont très fortement adsorbées sur la cellulose, vraisemblablement par interaction ionique avec les groupes carboxyliques disséminés toujours présents dans ce polymère. L'affinité dans ce cas est si grande que le processus est pratiquement irréversible. Les chaînes de PEI portent relativement beaucoup plus de charges que celles qui sont réellement concernées par l'adsorption, aussi convertissent-elles la cellulose en un échangeur anionique qui a trouvé son application dans la séparation des nucléo - tides et des oligonucléotides. Sa capacité importante (de l'ordre de 0,7 à 1,0 méq./g) la rend supérieure aux autres types de composés similaires. La facilité de sa préparation, qui n'exige aucune condition rigoureuse, a favorisé son utilisation; sous forme poudreuse (support pour la chromato - graphie sur colonne ou couche mince) ou de papier traité.

La chromatographie sur cellulose échangeur d'ions est basée sur le principe suivant: dans un mélange de plusieurs composants à séparer, des polyélectrolytes en général, chacun possède un certain nombre de charges qui, si elles sont de signe approprié, pourront réagir avec les ions de l'échangeur en créant des liaisons électrostatiques. Il est évident que l'affinité de la molécule ainsi adsorbée envers l'échangeur sera d'autant grande que le nombre des liens établis sera important. Mais, si la charge nette du composé reste le para -

mètre fondamental, la distribution de ces charges et l'en - combrement moléculaire ne sont pas pour autant des facteurs négligeables; de ce fait, la chromatographie par échange d'ions présente une certaine complexité comparée à la séparation sur tamis moléculaire ou l'électrophorèse.

Le processus de chromatographie sur colonne de cellulose modifiée est assez bien connu (PETERSON, 1970). Le principe de base rappelé dans ce qui précède peut aussi s'appliquer à la séparation sur couche mince en tenant néanmoins compte des différences inhérentes aux deux méthodes. La migration des substances déposées sur une couche d'échangeur d'ions s'effectue à des vitesses déterminées en présence de solvants; les facteurs qui les régissent sont nombreux:

- la charge nette et l'encombrement moléculaire des composés.
- leur affinité pour l'échangeur (c'est-à-dire le nombre de liaisons susceptibles d'être créées).
- la composition du solvant, un électrolyte en général caracté - risé par sa force ionique et son pH.

Les deux premiers points ayant déjà été abordés, nous n'envi - sagerons que l'effet de la concentration en ions salins et celui du pH.

Ions salins: les interactions ioniques entre le composé adsorbé et l'échangeur sont constamment dissociées et refor - mées du fait que les ions salins de la phase mobile peuvent entrer en compétition avec le composer pour se lier aux sites chargés de l'échangeur; cependant, si un nombre de charges de signe convenable est offert en suffisance par ce dernier, le nombre de liens établis entre l'échangeur et la molécule adsor - bée reste assez élevé pour que la probabilité d'une dissoci - ation simultanée soit pratiquement nulle; de ce fait, la molécule fixée reste immobile. Par contre, si la concentration en électrolytes augmente, la compétition devient plus efficace et la probabilité évoquée plus haut atteint une valeur finie;

ceci se traduit par une migration limitée de la molécule, à une vitesse d'abord inférieure à celle de la phase mobile mais qui augmente avec la teneur en ions salins pour finale - ment devenir maximum (et égale à celle du solvant); à ce moment, les ions salins sont en nombre suffisant pour annuler toutes les interactions effectives en chacun des sites d'ad - sorption.

Effet du pH: le pH du solvant est un autre facteur important. Il est bien connu, en effet, que le pH du milieu agit directe - ment sur le degré d'ionisation des groupes polaires chargés. Dans nôtre cas, toute modification du pH entraînera une modification du nombre de charges disponibles pour la fixation, c'est à dire de l'affinité des molécules à séparer pour l'échangeur. Concernant les nucléotides, cet effet est interes - sant car ces composés restent solubles aux basses valeurs du pH requises pour modifier leur charge.

4.1.2 Préparation des couches minces de PEI-cellulose.

a/ Support: les premières couches de polyéthylèneimine-cellulose étaient préparées sur des plaques de verre (RANDERATH et RANDERATH, 1965) selon la méthode traditionnelle; mais il s'est révélé avantageux de remplacer ces plaques par une longue feuille de matière plastique vinylique (rigid vinyl sheet Bakelite_ , 21x50 inches, type VSA 3310 clear matte 06- 0.01 inch, Union Carbide Co, Cincinnati-Ohio ou Silador papier GmbH, ZH Suisse). Ce support présente des avantages certains:

- la PEI-cellulose y adhère très fortement; les lavages répétés ou le processus de chromatographie n'ont pas tendance à détacher la portion de couche immergée.
- la couche peut être étalée de façon homogène et régulière, en une seule fois, ce qui prévient les inévitables 'sauts' liés à la discontinuité des anciennes plaques.
- la feuille est suffisamment mince pour être coupée à la longueur désirée d'où une manipulation aisée.

le matériel vinylique est stable vis-à-vis des solutions aqueuses et de la plupart des solvants organiques (alcools, éthers etc.) ordinairement utilisés; sa rigidité assez bonne pour que les feuilles puissent tenir verticalement dans les cuves à chromatographie.

-enfin, contrairement au verre, ce support plastique n'absorbe pas la lumière ultra-violette, ce qui permet une meilleure détection des dérivés nucléiques dont l'absorption est maximum dans cette région du spectre.

Une longue feuille plastique est coupée aux dimensions de 21x125 cm et lavée soigneusement sur ses deux faces à l'aide d'un détergeant commercial. Elle est longuement rin - cée à l'eau courante puis égouttée. On la place alors sur une plaque de verre (21,5x125x0,6 cm) dont on a contrôlé l'horizontalité, de façon à ce que cette plaque soit légère - ment protubérante (environ 0,5 cm). L'eau en excés entre la feuille et la plaque est drainée vers l'extérieur en éliminant aussi bien que possible les poches d'air emprisonnées; dans ces conditions, la feuille plastique est fermement tenue en place par des forces de cohésion (on peut éventuellement renforcer la fixation par du papier adhésif aux deux extré - mités).

b/ Suspension de PEI-cellulose: la polyéthylèneimine ou Polymin P (BASF Co, West-Germany) est délivrée sous forme aqueuse à 50%. 200 g de cette solution sont mélangés à de l'eau bidistillée (volume final:500 ml) puis le pH est ajusté à 5,5 -6,0 par de l'acide chlorhydrique concentré, sous agi - tation énergique. On complète le volume à 1 000 ml. 20 ml de cette solution sont dialysés contre 4 litres d'eau (tubes à dialyse: Ø=5 cm, longueur=20 cm); après 24 h, le contenu du sac (dont la pression interne et le volume ont augmentés sous l'effet des forces osmotiques) est ammené à 200 ml par de l'eau; ceci correspond à une solution de PEI à 1%.

22 g de cellulose NM 300 sont suspendus dans 145 ml de cette solution de PEI à 1% et mélangés grossièrement. On homogénéise le tout dans un mixer électrique (30 secondes à la vitesse maximum). L'homogénat est rapidement transféré dans un bécher et remué délicatement pendant quelques minutes à l'aide d'une baguette de verre pour éliminer les bulles d'air résiduelles. Le mélange est alors versé dans un appli - cateur DESAGA (DESAGA GmbH, Heidelberg, West-Germany) dont la largeur de fente a été réglée à 0,5 mm. On recouvre immé - diatement la feuille préparée (il reste une bande de 1 cm de large qui reste libre sur toute la longueur supérieure desti - née à faciliter les manipulations ultérieures). On laisse sécher 24 heures au moins à température ambiante (en aucun cas le séchage ne doit être accéléré par chauffage ou courant d'air!); dans ces conditions, les propriétés d'échange sont supérieures. La couche mince est alors débitée en pièces plus étroites (10 à 20 cm de large) en éliminant les deux extrémités de la feuille, soit une zône de 10 cm environ où l'épaisseur de la couche n'est pas régulière.

c/ Lavage des plaques: ces lavages sont indispensables pour, d'une part, enlever les impuretés pouvant géner la chromatographie, d'autre part, maintenir une capacité d'échan - ge optimum. Le processus utilisé est le suivant:

Chaque plaque est d'abord traitée par une solution saline (800 à 1 000 ml de NaCl 10%). L'immersion se pratique per - pendiculairement au sens d'application de la couche; on commence par une extrémité pour, très lentement, laisser glisser la feuille dans la solution à mesure que le liquide monte par capillarité. Après 1 minute de traitement, la plaque est retirée, égouttée et séchée (pratiquement on la suspend le long d'un fil tendu). On renouvelle toutes ces opérations en remplaçant le chlorure de sodium par de l'eau déionisée. Pour terminer, on procède à un ultime lavage

sous forme de chromatographie ascendante en continu dans une cuve contenant de l'eau déionisée; une feuille de papier Whatmann 3MM fixée sur l'extrémité supérieure de la couche assure un drainage ininterrompu des impuretés et du NaCl résiduel (pour augmenter son efficacité, le papier est replié sur la partie postérieure de la plaque et sa base découpée en "dents de scie"). Après séchage, les couches minces sont conservées au congélateur (-40°C), à l'abri de la lumière. Dans ces conditions la durée de leur utilisation est de plusieurs mois.

4.1.3 Purification des extraits.

Les extraits perchloriques contenant les nucléotides libérés par hydrolyse alcaline du RNA ne peuvent être chromatographiés tels-quels; il est indispensable de les concentrer vue leur faible teneur en ces composés. Malheureusement, cette opération réalisée par dessication sous vide en présence d'un agent deshydratant ou par lyophilisation entraîne la cristallisation des sels du milieu (comme le perchlorate de potassium formé par neutralisation de l'acide perchlorique en excés) qui perturbent fortement la migration des nucléotides chromatographiés. Une autre méthode (BROWN, 1962) s'est révélée plus satisfaisante: elle consiste à adsorber ces nucléotides sur du charbon actif (connu pour fixer les dérivés puriques et pyrimidiques par des liaisons polyvalentes encore mal connues), à les laver puis à les éluer par un mélange approprié. Outre la disparition des sels cette technique a l'avantage de purifier l'extrait notamment par l'élimination de quelques contaminants (peptides résiduels) absorbant l'uv.

a/ adsorption: 60 à 100 mg de charbon actif 'Norit OL'* sont mélangés à 100 mg de Célite 535 (Hyflo supercel) et suspendus dans de l'eau déionisée. L'homogénat est lavés plsieurs fois par décantation puis déposés dans une colonne

* Norit OL de Hopkin & Williams Ltd. Essex (GB)

pour chromatographie (diamétre: 11,0 mm-hauteur: 300 mm) portant dans sa partie inférieure un disque de verre fritté (P3) recouvert d'une couche de célite de 2 à 3 mm d'épais - seur (fig. 18). L'extrait perchlorique contenant les nucléo - tides est ajusté à pH 8,0 par une solution d'hydroxyde de potassium concentrée; toutes ces solutions sont maintenues à 2°C pour éviter une dégradation des composés à la suite de cette réaction exothermique. On laisse reposer une nuit à froid ce qui favorise la formation des cristaux de $KClO_4$ qu'on élimine par la suite (centrifugation ou filtration). La solution est alors acidifiée par de l'acide acétique 1,0 N (pH fixé à 4,0 - 4,5) puis passée sur la colonne préparée précédemment sous un faible débit (0,3 ml/min). On lave l'adsorbant en faisant passer de l'eau déionisé, dans les mêmes conditions, jusqu'à ce que le pH à la sortie de la colonne soit neutre.

b/ élution: les nucléotides adsorbés sont élués par 15 ml d'un mélange aqueux d'éthanol-ammoniaque (éthanol qualité 'Uvasol'-Merck- 25% v/v, contenant 0,5% v/v d'ammoniaque de poids spécifique=0,88) en appliquant une légère pression positive (air comprimé) au sommet de la colonne. Pendant toutes ces opérations le lit de charbon doit toujours rester humide! L'éluat évaporé à sec, sous vide, à la température de 30°C est repris par quelques microlitres d'eau déionisée (200 µl) qui serviront pour la chromatographie.

c/ taux de récupération: il a été estimé de la façon suivante: 0,3 ml de RNA commercial hydrolysé sont dilués à 5 ml par de l'eau déionisée et acidifiés à pH 4,0 par de l'acide acétique 1,0 N. La solution est passée sur la colonne et éluée selon la technique décrite plus haut. L'éluat, soit 15 ml de mélange éthanol-ammoniaque, est évaporé à sec puis repris par 5 ml d'une solution de KOH-APC (voir dosage du RNA); on mesure alors la DO à 260 et 290 nm. La teneur initiale en RNA se détermine parallèlement en diluant les 0,3 ml de RNA

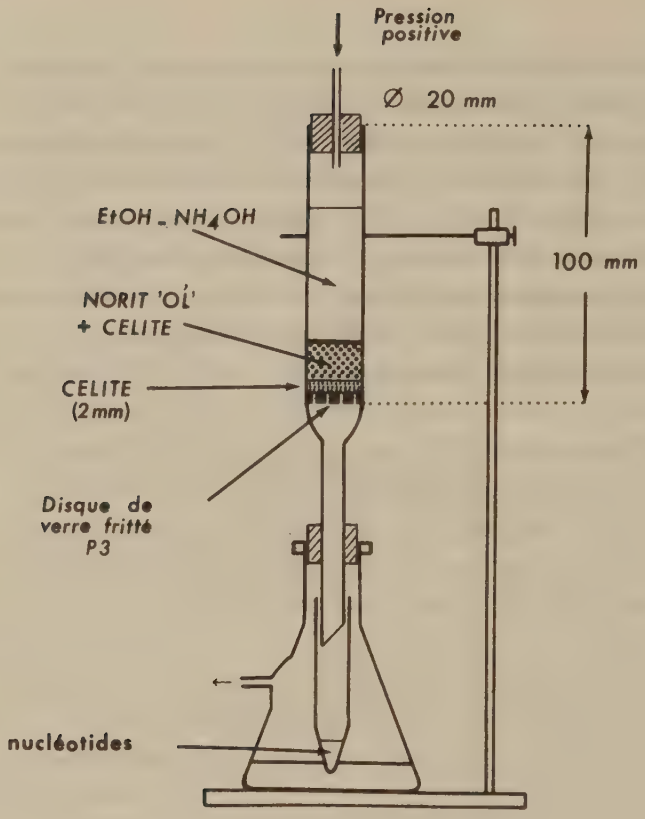


Fig. 18 - Colonne de charbon NORIT OL et Célite 535: Dispositif pour l'adsorption et l'élution des nucléotides

dans 4,7 ml de la solution précédente. Quant à l'absorption propre du solvant d'élution, on l'estime en traitant 15 ml de ce dernier d'une manière identique à celle utilisée pour l'éluat. Les résultats sont donnés dans le tableau 17.

La récupération des nucléotides est de l'ordre de 60 % et ne varie pas pour un même lot de charbon activé. SEBESTA et SORM (1959) trouvent une perte de 38,2 % sur Norit A et BROWN (1962) de 20 à 28 % sur Norit OL suivant la nature des nucléotides.

Le spectre uv de la solution de RNA hydrolysé avant et après passage sur la colonne de Norit OL a été étudié au chapitre III, 3.2; on peut constater que ce traitement améliore le spectre, particulièrement dans la région comprise entre 260 et 220 nm et tend à le rapprocher de celui du standard.

TABLEAU 17

RECUPERATION DES NUCLEOTIDES APRES PASSAGE SUR NORIT OL

Essais	DO_{260}	DO_{290}	ΔDO 260-290	µg équ. RNA/5 ml	% R*	M
Nucléotides avant traitement	1,670	0,556	1,114	281,3	100	100
Nucléotides après traitement						
1	1,052	0,370	0,682	172,1	61,18	
2	1,012	0,355	0,657	165,9	58,98	
3	1,030	0,362	0,668	168,8	60,00	60,3
4	1,048	0,368	0,680	171,6	61,02	

* % de récupération.

4.1.4 Séparation des nucléotides.

a) principe: les mononucléotides sont séparés par chro - matographie ascendante sur couche mince de PEI-cellulose en utilisant comme solvants des solutions aqueuses d'électro - lytes comme l'acide acétique ou le chlorure de lithium. La technique d'élution par paliers successifs (RANDERATH et RANDERATH, 1965) permet de réaliser ce processus en une seule dimension (ce qui augmente la sensibilité de la méthode et permet de chromatographier plusieurs échantillons sur une même plaque). La vitesse de migration des nucléotides est déterminée par la concentration en électrolytes des solvants utilisés d'une façon caractéristique pour chacun d'eux; leur mobilité est aussi fonction de leur charge négative nette, laquelle dépend du pH (fig.19).

b) technique de la chromatographie: l'échantillon à chro - matographier est déposé à 3 cm du bord inférieur de la plaque de PEI-cellulose, sous forme de trois ou quatre tâches adja - centes. Il est indispensable de déposer la solution (de 5 à 50 µg) par petites portions de un ou deux µl à la fois à l'aide de capillaires "microcaps", sous un courant d'air froid; les nucléotides fortement adsorbés sur l'échangeur restent concentrés à leur point de dépôt. Sur la même plaque (où l'extrait végétal a été appliqué) on dépose comme contrôle:

- 20 µl de RNA hydrolysé (RNA commercial à 1 µg/µl)
- 5 µl de chacun des monoribonucléotides (1 µg/µl soit environ 4 mµMoles/µl d'un mélange équimoléculaire d'isomères 2'+3' d'AMP, CMP, GMP et UMP de Sigma chemical Co, 5^{t} Louis USA).
- 20 µl d'un mélange stoechiométrique des quatre composés précédents.

Le développement de la chromatographie s'effectue d'abord par de l'acide acétique 1,0 N sur une distance de 4 cm depuis l'origine, puis par une solution de chlorure de lithium (0,3 M). La plaque est transférée d'un solvant à l'autre sans séchage

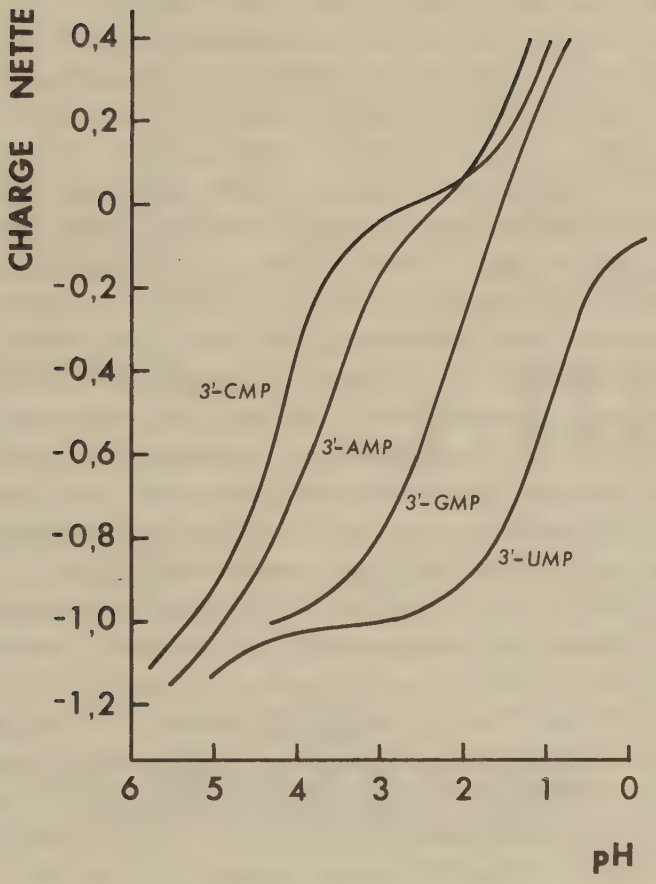


Fig. 19 - Charge nette par molécule de ribonucléotide en fonction du pH.

W.E. COHN, dans The nucleic acids, vol.1 p.222, Ed. E. Chargaff et J.N. Davidson, Academic press, 1955

intermédiaire. La migration est poursuivie jusqu'à ce que le front du LiCl atteigne une hauteur de 16,5-17 cm depuis le "spot" initial. Après séchage les nucléotides sont localisés sous lumière uv courte (254 nm, Uvanalys); la limite de détection de ces composés (de l'ordre de 0,05 à 0,30 mμMoles) varie avec leur coefficient d'extinction molaire (ε), la nature du solvant, la distance de migration et le Rf. On peut diminuer ce seuil en vaporisant sur la plaque une solution de méthanol contenant du fluoresceinate de sodium à 0,002 % (p/v).

Comme le représente la fig.21), le RNA hydrolysé se sépare en 5 tâches: trois correspondent au CMP, GMP et UMP (sans séparation des formes 2' et 3') tandis que les deux autres représentent les isomères 2' et 3' de l'AMP. Les valeurs du Rf diminuent dans l'ordre suivant: 2'+3'-CMP < 2'-AMP < 3'-AMP < 2'+3'-UMP < 2'+3'-GMP. Chacun des nucléotides provenant de l'hydrolyse du RNA de pois a été, de plus, caractérisé par son spectre et certains rapports de l'absorbance mesurée à certaines longeurs d'onde (250, 260 et 280 nm). Pour établir ces spectres, le composé localisé sous lumière uv est d'abord transféré sur une bande de papier Whatmann No. 1 (1,2 x 3 cm) lavé par HCl 0,1 N et séché, selon la méthode de RANDERATH et RANDERATH (1965); ce papier découpé en piéces plus petites est placé dans un tube à centrifuger contenant 1 ml d'HCl 0,1 ou 0,01 N (pH 2 ou 1). Après 12-16 heures, l'éluat est séparé par centrifugation (5'000 tpm) et son spectre enregistré contre un blanc obtenu par un processus similaire sur une zône du chromatogramme située au niveau du nucléotide examiné mais ne présentant aucune absorbance en uv. La comparaison des spectres obtenus avec ceux des standards appropriés (tableau 18) a permis de confirmer l'identité des nucléotides séparés.

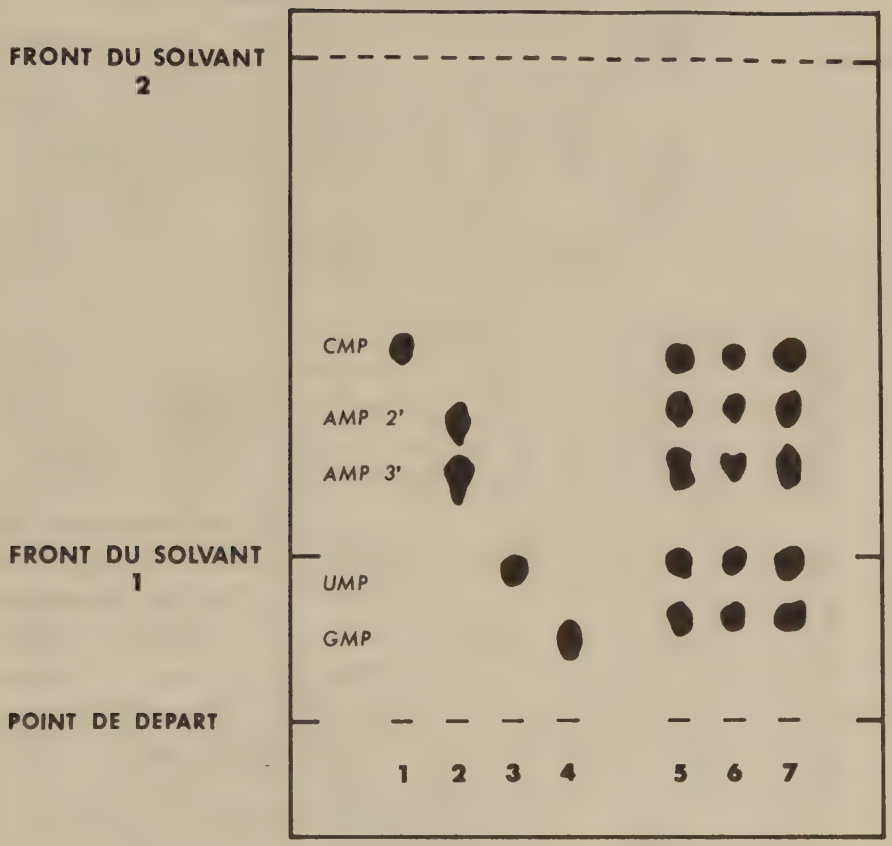


Fig. 20

CHROMATOGRAPHIE DES MONORIBONUCLEOTIDES
SUR COUCHE MINCE DE PEI-CELLULOSE

1 CMP 2'+ 3'
2 AMP 2'+ 3'
3 UMP 2'+ 3'
4 GMP 2'+ 3'
5 Mélange des isomères précédents
6 RNA de Pois hydrolysé
7 RNA standard hydrolysé

TABLEAU 18

CARACTERISTIQUES DU SPECTRE DES MONORIBONUCLEOTIDES

Nucléotides	Standards						RNA de Pois		
	PM	pH*	λMax (nm)	εMax**	$\frac{250}{260}$ [1]	$\frac{280}{260}$	λMax (nm)	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$
2'-AMP Acide adénylique (2')	347,2	2	257	14,4	0,85	0,23	257	0,84	0,23
3'-AMP -.- (3')	-	2	-	-	0,85	0,22	-	0,85	0,23
2'-CMP Acide cytidylique (2')	323,2	2	278	12,7	0,48	1,80	280	0,47	1,87
3'-CMP -.- (3')	-	2	279	13,0	0,45	2,00			
2'+3'-GMP Acide guanylique (isomères 2'+3')	363,2	1	257	12,2	0,90	0,68	259	0,93	0,70
2'-UMP Acide uridylique (2')	324,2	2	262	9,90	0,80	0,28	260	0,78	0,31
3'-UMP -.- (3')	-	2	-	-	0,76	0,32			

* Dans HCl 0,1 N (pH 1) ou HCl 0,01 N (pH 2).

** εMax x 10^{-3}.

1 rapport des absorbances à 250 et 260 nm

4.1.5 Mesure de la radioactivité.

Lorsque les différents extraits de RNA de pois ont été chromatographiés, les nucléotides séparés sont localisés sous lumière ultra-violette courte (256 nm) et leur position (ou Rf) soigneusement relevée sur un papier calque. On délimite alors le long de chacun des chromatogrammes des rectangles de 2 cm de longueur sur 0,5-1 cm de largeur quadrillant ainsi toute la surface de migration. On s'arrange pour que les tâches correspondant aux différents nucléotides ne se trouvent chacune que sur un seul de ces rectangles. Après avoir découpé avec précaution ces bandes de couche mince, on les plonge individuellement dans 10 ml de mélange scintillant (omnifluor-éthanol-toluène). Après un temps de contact de 3 heures au minimum on procède au comptage; la PEI-cellulose se détache d'elle-même du support vinylique et se présente sous l'aspect d'un film translucide, ce qui assure une reproductibilité parfaite. Le rendement est de 70,1 % et a été calculé de la façon suivante: 100 µl de solution radioactive standard (uridine 2-^{14}C) sont comptés d'abord directement, puis après qu'on les ait déposés sur une bande de PEI-cellulose; le rapport des cpm obtenus dans chacun des cas donne la valeur du rendement.

4.2 Résultats expérimentaux.

4.2.1 Localisation de la radioactivité.

50 µl de chacun des extraits purifiés (0,2 ml au total), correspondant aux sections S_0 et S_3 sans traitement (TE) ou traitées par de l'AIA 10^{-6}M (TR), ont été chromatographiés dans les conditions déjà décrites; les quatre solutions et un standard (RNA hydrolysé) sont déposés sur une même plaque; chacune des séparation est réalisée en triple.

La radioactivité initiale se répartit qualitativement de manière identique pour tous les extraits analysés. La seule différence est d'ordre quantitatif; en effet, comme le montre

un des diagrammes obtenus (figure 21), la radioactivité est pratiquement toute concentrée au niveau de deux nucléotides reconnus comme étant la cytidine et l'uridine 2'+ 3'monophosphate.En outre, le marquage (exprimé en cpm) au niveau du premier est environ 4,5 fois moins important qu'au niveau du second. Ces résultats seront commentés dans le paragraphe suivant (5.).

Les données quantitatives concernant la radioactivité de l'UMP et du CMP ont été reportées dans le tableau 19. Pour chacun des essais considérés, la radioactivité est exprimée de la façon suivante:

- en cpm pour 50 µl d'extrait, soit le volume de solution déposé sur la couche mince et nécéssaire pour la séparation.
- en dpm pour 0,2 ml d'extrait-ce qui correspond à la totalité du RNA hydrolysé ou 25 sections d'épicotyle-en tenant compte de deux facteurs correctifs (rendement du comptage et de la chromatographie) pour transformer les cpm en dpm.

Le rapport CMP/UMP introduit exprime la proportion relative (en dpm) de ces deux nucléotides. Enfin, le pour-cent de récu - pération (% R) représente la radioactivité finale restante après chromatographie (ou la somme UMP+CMP) par rapport à la radioactivité initiale (RNA hydrolysé), après passage sur charbon actif (perte évaluée à 39,7%).

Dans les deux types d'essai (S_o et S_3), on constate que la radioactivité de l'UMP ou du CMP pour les lots témoins (TE) est inférieure à celle des traités (TR); la différence est respectivement de 15,2 et 43,7 %. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés précédemment (cf. § 3.). Quant au rapport CMP/UMP, il reste constant dans tous les cas; l'interprétation la plus probable de ce fait est que le traitement par l'AIA ne provoque pas de perturbation dans la biosynthèse des composés pyrimidiques mais pourrait influencer la vitesse d'incorporation des nucléotides triphosphates formés au niveau

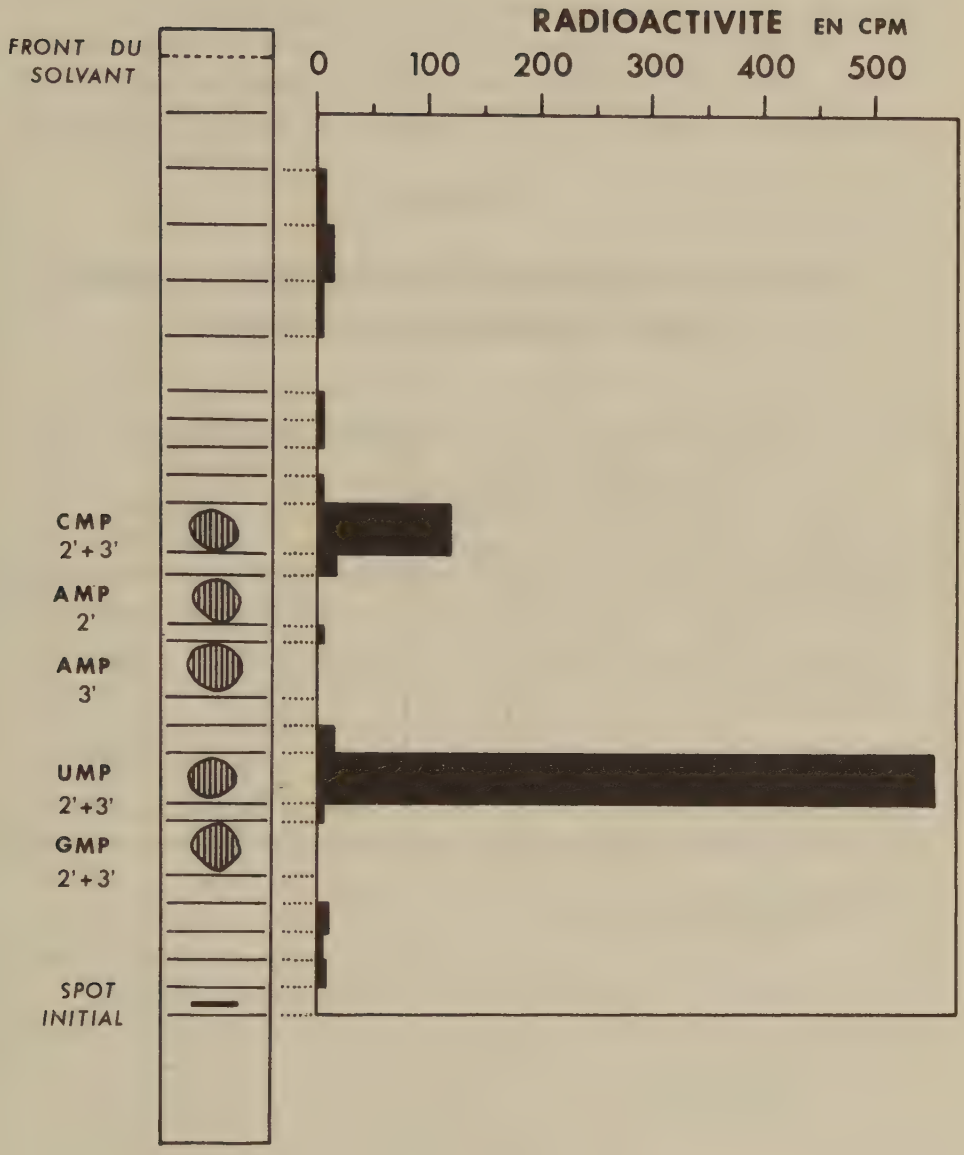


Fig. 21 - Répartition de la radioactivité (cpm) des ribonucléotides monophosphate libérés par hydrolyse du RNA de Pois marqué par l'uridine 2-^{14}C et séparés sur couche mince de PEI - cellulose

TABLEAU 19

RADIOACTIVITE DE L'URIDINE ET DE LA CYTIDINE 2'+ 3' MONO PHOSPHATE ISOLEES PAR CHROMATOGRAPHIE

Essais *	UMP		CMP		CMP/UMP	% R[1]
	Cpm 50 µl	Dpm 200 µl	Cpm 50 µl	Dpm 200 µl		
So (TE)	480	4'300	106	932	0,216 ± 0,007	57,1
So (TR)	564	4'956	114	1'000	0,202 · 0,003	57,9
S3 (TE)	249	2'202	54	475	0,216 0,005	58,0
S3 (TR)	360	3'165	73	648	0,212 0,004	57,2

* voir tableau 16
1 % de récupération

de certaines classes de RNA; il a été aussi démontré que le traitement des tissus par l'AIA ne modifie pas sensiblement le taux de pénétration du précurseur marqué et ne peut être un facteur limitant de l'incorporation des dérivés triphosphates au niveau du RNA.

5. Métabolisme des composés pyrimidiques.

5.1 Synthèse normale des acides uridyliques et cytidyliques.

La plupart des étapes biochimiques conduisant à la synthèse des dérivés pyrimidiques ont été établies pour certains microorganismes ou des cellules animales (REICHARD, 1959;CROSBIE, 1960). La séquence des réactions enzymatiques probables est représentée dans la figure 22, avec en annexe les enzymes ou les systèmes enzymatiques accompagnés de leur numérotation (EC) selon la Commission internationale sur les enzymes.

Tout d'abord, il faut mentionner une distinction fondamentale entre la formation des nucléotides puriques et les pyrimidiques; dans le premier cas, la liaison N-glucosidique s'établit très tôt, suivie de la construction du noyau purique; dans le second cas, au contraire, le cycle pyrimidique complet se réalise avant d'être lié au ribose-5-phosphate.

L'étape initiale est la synthèse de carbamyl phosphate à partir de CO^2 et de NH_3; cette réaction (1), catalysée par la carbamyl phosphate synthétase, est la seule voie trouvée chez les mammifères. Les microorganismes, par contre, possèdent une carbamate kinase opérant comme suit:

$$NH_2CO_2^- + ATP = \underset{\text{carbamyl phosphate}}{NH_2COOPO_3H_2} + ADP$$

Les réactions suivantes, avec pour intermédiaires le carbamyl

Annexe de la fig. 22

Enzymes impliquées dans les différentes réactions.

Chaque enzyme est désignée par son nom systématique, son numéro (EC) et son nom courant. Certains facteurs importants qui participent à la réaction ont été mentionnés.

1.- Anabolisme normal.

1 ATP:carbamate phosphotransferase 2.7.2.a (carbamate kinase) + acétylglutamate, ATP et Mg^{++}.

2 Carbamoylphosphate:L-aspartate carbamoyl transferase 2.1.3.2 (aspartate carbamoyl transferase) + L-aspartate.

3 L-4,5-dihydro-orotate amidohydrolase 3.5.2.3 (dihydro orotase)

4 L-4,5-dihydro-orotate:NAD oxydoréductase 1.3.3.1 (dihydro-orotate deshydrogénase) + NAD.

5 Orotidine-5'-phosphate:pyrophosphate phosphoribosyltransferase 2.4.2.10 (orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase) + PRPP* et Mg^{++}.

6 Orotidine-5'-phosphate carboxy lyase 4.1.1.23 (orotidine-5'-phosphate décarboxylase).

7 ATP:nucléoside monophosphate phosphotransferase 2.7.4.4 (nucléoside monophosphate kinase) + ATP et Mg^{++}.

8 ATP:nucléoside diphosphates phosphotransferase 2.7.4.6 (nucléoside diphosphates kinase) + ATP et M (2+)**

9 UTP:ammoniaque ligase 6.3.4.2 (CTP synthétase) + ATP ou GTP, NH_3 ou glutamine et Mg^{++}.

10 Nucléoside triphosphates:RNA nucléotidyltransferase 2.7.7.6 (RNA nucléotidyl transferase).

2.-Anabolisme complémentaire.

11 Uridine:orthophosphate ribosyltransferase 2.4.2.3 (uridine phosphorylase) + D-ribose-1-phosphate.

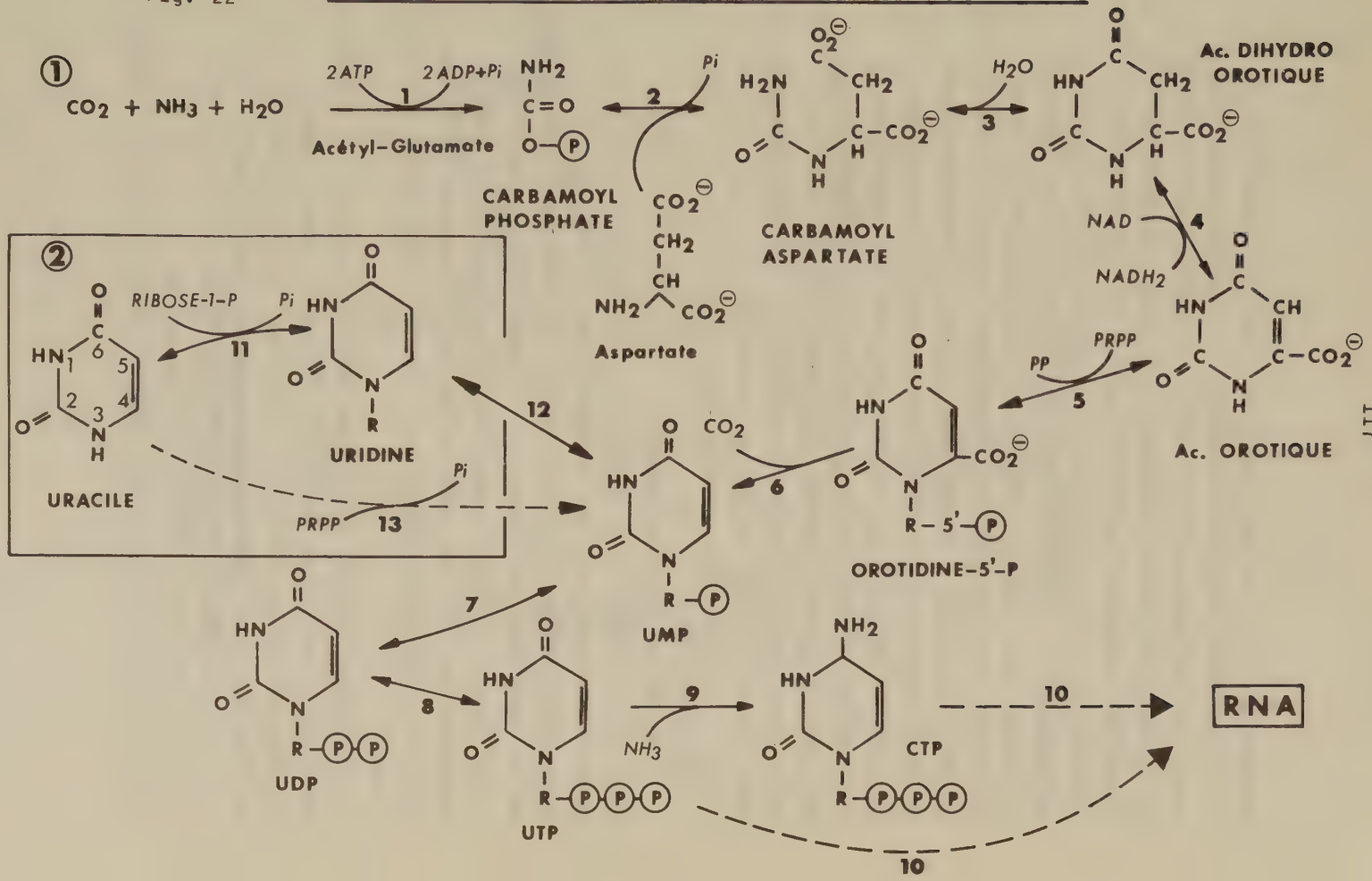
12 Uridine-5'-phosphotransferase 2.7.1.f (uridine kinase) + ATP ou GTP et M (2+)

13 UMP:pyrophosphate phosphoribosyltransferase 2.4.2.9 (UMP pyrophosphorylase) + PRPP.

* PRPP = 5-phospho-α-D-ribosyl pyrophosphate.
** M (2+) = ion métallique bivalent.

Fig. 22

BIOSYNTHESE DES COMPOSES PYRIMIDIQUES



aspartate (2) et l'acide dihydro orotique (3) aboutissent au premier composé important possédant un cycle pyrimidique com - plet: l'acide orotique (4). A ce niveau intervient le couplage du ribose-5'-phosphate (introduit sous forme de 5-phospho-α-D-ribosyl pyrophosphate ou PRPP) pour former l'orotidine-5'-phosphate ou OMP (5), elle-même transformée en UMP par une décarboxylation irréversible (6). Soumise à l'action successive de kinases appropriées, l'UMP est convertie en UDP (7) puis en UTP (9). Une partie de l'uridine triphosphates est incorporée au RNA, en présence d'une RNA polymérase (ou nucléotidyltrans - ferase), l'autre subit un processus d'amination pour donner la cytidine triphosphates (CTP); cette réaction est la seule voie de synthèse normale des dérivés de la cytidine; elle est dirigée par la CTP synthétase et utilise l'ammoniac ou la glutamine comme source de groupes amino, un cofacteur énergétique comme l'ATP ou le GTP et des ions magnésium.

(9) $$UTP + NH_3 + ATP \xrightarrow[Mg^{2+}]{} CTP + ADP + Pi$$

La cytidine triphosphates est, à son tour, incorporée au RNA (10). Il a été aussi montré que le CTP pouvait participer à la synthèse des désoxypyrimidines comme la thymidine ou la désoxycytidine; celles-ci sont alors intégrées dans l'anabolisme du DNA sous forme de triphosphates. Comme le montre la figure 23, le CDP issu du CTP est d'abord réduit en désoxy-CDP (dCDP), transformé en dCMP, en dUMP, méthylé en thymidine monophosphate (TMP) dont la phosphorylation en TDP et TTP représente le stade final.

Le catabolisme des pyrimidines commence d'abord par la dégra - dation des nucléotides en nucléosides puis en bases libres; la réduction de ces dernières (uracile et cytosine) conduit à un dihydro dérivé, lequel libère, par ouverture du cycle, du CO_2(uréido carbone-2), du NH_3 et de la β-alanine. Pour l'UMP, les étapes du catabolisme sont les suivantes:

UMP → Uracile → dihydro uracile → uréido propionate → CO_2+NH_3+βalanine

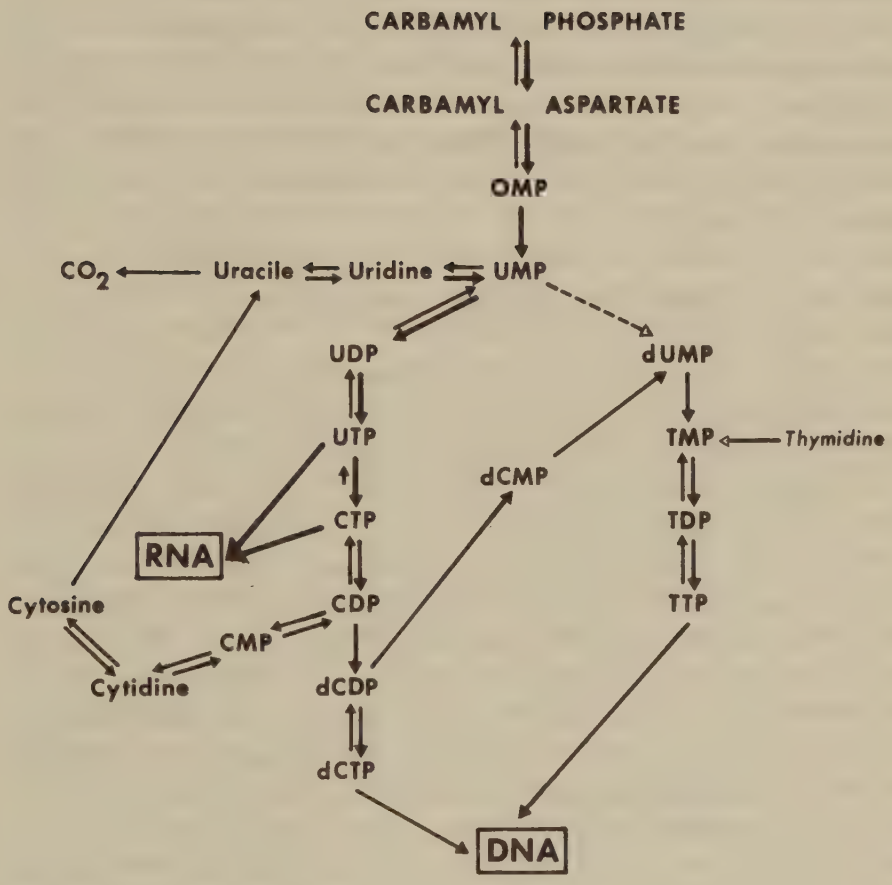


Fig. 23 RELATION ENTRE LES RIBO- ET DESOXYRIBONUCLEOTIDES PYRIMIDIQUES

5.2 Voies de synthèse dérivées.

En considérant la succession des étapes conduisant à la synthèse des dérivés pyrimidiques et à leur incorporation au niveau du RNA, il est évident que ni les bases libres ni les nucléosides qui leur correspondent ne sont des intermédiaires normaux; cependant, les cellules animales ou végétales sont capables de les utiliser; ainsi, chez les plantes supérieures, l'uracile, l'uridine et la cytidine sont activement métabolisées et se retrouvent dans le RNA (EVANS et AXELROD, 1961). Cela signifie que la cellule possède des voies de synthèse addition - nelles et des systèmes enzymatiques de "secours" qui lui permettent d'utiliser certaines sources exogènes comme les bases ou les nucléosides préformés. Ainsi l'uracile fournie à des tissus peut être transformée en UMP dans le milieu intra - cellulaire de deux façons: directement, sous l'action d'une phosphoribosyltransferase spécifique (13) selon le modèle de CRAWFORD, KORNBERG et SIMMS (1957), ou indirectement, via l'uridine (11 et 12); si l'uracile est remplacée par de l'uri - dine, cette dernière donne aussi de l'UMP en présence d'une uridine kinase (12) (CANELLAKIS, 1957).

L'utilisation généralisée de bases ou de nucléosides marqués pour suivre le métabolisme des macromolécules (DNA ou RNA) réside dans le fait que ces précurseurs entrent librement dans la cellule pour être incorporés dans le "pool" des nucléotides; leur efficacité est la résultante d'un équilibre entre plusieurs facteurs (taux de pénétration, catabolisme et anabolisme). En général les nucléosides sont moins dégradés que les bases car ils n'ont que peu de modifications à subir avant de rejoindre les voies métaboliques courantes; par contre, les bases diffusent plus rapidement. Les nucléotides (CMP, UMP, TMP etc.) seraient de bons précurseurs si leur pénétration n'était pas aussi lente et limitée; ctte faible perméabilité (ou manque de trans - port actif) au niveau de la membrane plasmique explique, inver -

sément, que le matériel nucléotidique engagé dans les "pools" soit efficacement retenu dans le milieu intra cellulaire; par exemple, PRESCOTT (1962) marquant des cellules de Tetrahymena par de la cytidine-^{14}C constate que ce précurseur est rapide - ment converti en CMP, CDP, UMP, UDP et UTP et ces composés ne diffusent apparemment pas hors des cellules encore vivantes tranférées dans un milieu de lavage non radioactif; de plus, l'addition au milieu d'un excés de nucléosides non marqués n'a pas d'effet sur l'utilisation des nucléotides marqués intégrés dans le "pool" interne, de sorte que celui-ci reste probable - ment constant et indépendant de la concentration externe en nucléosides.

5.3 Efficacité des précurseurs pyrimidiques

Le métabolisme des pyrimidines chez les plantes supérieures n'est pratiquement pas différent de celui décrit pour les tissus animaux ou les microorganismes.(KAPOOR et WAYGOOD, 1961; NEUMANN et JONES, 1962). ROSS (1965), comparant l'efficacité de divers précurseurs pyrimidiques à marquer le RNA, dans des feuilles de Haricot, fait les remarques suivantes:

Environ 7,8 % de la cytosine-2^{14}C ajoutée sont absorbés. L'absorption est un peu plus faible pour le DL aspartate-3^{14}C, l'uridine-2^{14}C, l'uracile -2^{14}C et l'acide orotique-2^{14}C (respectivement 5,67,-5,58,-5,53,- et 4,26 %); pour le DL carbamyl aspartate-3^{14}C, le taux n'est que de 1,9 %. A l'exception de la cytosine, tous les autres composés sont activement métabolisés et leur incorporation au RNA peut être mesurée. Le % d'incorporation au RNA par rapport à l'absorption totale est de 13 % pour l'acide orotique et 8,5 % pour l'uri - dine. A part le RNA, d'autres dérivés pyrimidiques sont aussi marqués, en présence d'uridine-2^{14}C (ROSS et al, 1971): UMP, UDP, UTP, UDP-hexoses, uridine et uracile. Pour le RNA, on détecte après hydrolyse la présence des acides uridyliques

et cytidyliques (UMP et CMP). L'UMP est beaucoup plus marqué que le CMP, ce qui s'explique facilement en considérant la fig. 22; en effet, l'UTP est incorporé au RNA avant le CTP puisque celui-ci dérive du premier. Le rapport CMP/UMP trouvé par ROSS et al. (1971) est de 0,2 à 0,3 (RNA de cotylédons de Pois (Pisum sativum L.cv. Alaska). Dans notre matériel, nous avons un rapport CMP/UMP de 0,2 (tableau 19) qui semble donc normal pour une période de marquage légèrement plus courte que celle pratiquée par ces auteurs (4 hr au lieu de 6 hr). Il est aussi évident que pour de longs temps de marquage, le rapport augmente mais reste inférieur ou égal à 1.

6. Conclusion

Les points suivant ont été établis:

- La biosynthèse du RNA au cours de la croissance, dans des tissus excisés d'épicotyle de Pois, est proportionnelle: à la teneur initiale de ces tissus en acide ribonucléique, et à leur potentiel de croissance endogène.

- Pour ces tissus, la stimulation de croissance induite par l'AIA exogène est intimement associée à l'augmentation de la formation du RNA.

- Des analyses plus poussées (purification et chromatographie du RNA synthétisé) confirment le point précédent. De plus, il a été montré que l'incorporation du précurseur marqué (uridine -2 ^{14}C) se déroule selon des voies biochimiques identiques pour les tissus traités par l'AIA comme pour les non-traités. Le mécanisme de l'absorption et de l'incorporation est conforme à ceux qui ont été décrits pour d'autres types de tissus végétaux et animaux, ou pour des microorganismes.

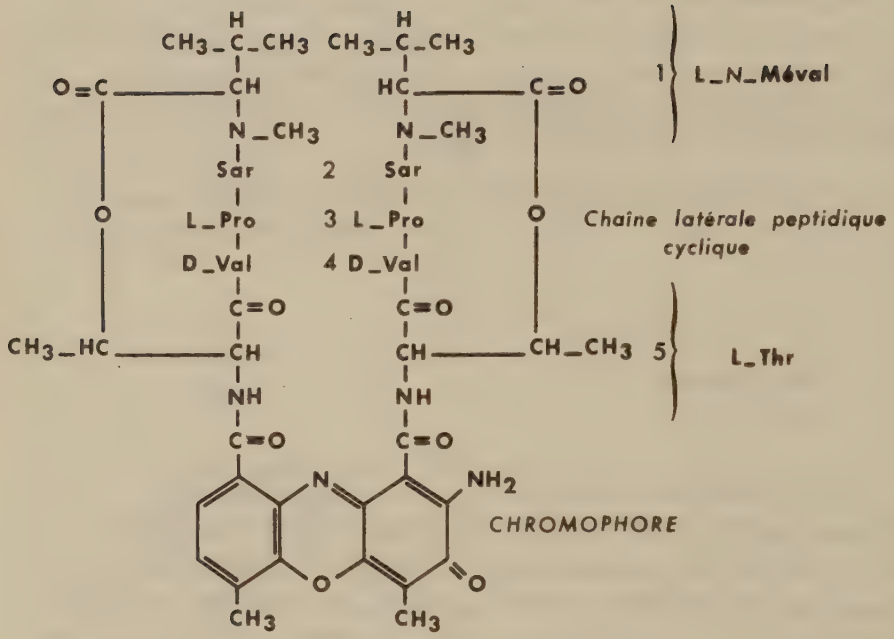
CHAPITRE VI

EFFETS D'INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTION SUR L'ELONGATION CELLULAIRE ET LA BIOSYNTHESE DU RNA

1. Introduction

La synthèse continue de certaines classes de RNA (RNA messagers) paraît indispensable pour que l'élongation cellulaire des tissus végétaux intacts ou excisés puisse s'accomplir (KEY et al., 1967). Les auxines, dont l'activité régulatrice sur la croissance est établie (PILET, 1961), influencent nettement le métabolisme des acides nucléiques (KEY, 1969), et leur intervention au niveau de la transcription a été démontrée (MORRÉ, 1972). Soit directement, soit liées à un récepteur protéinique ou en libérant un facteur régulateur associé au plasmalemme (LESHEM, 1973), les auxines augmente - raient la capacité matricielle du DNA (dérépression du génome) ou l'activité des RNA-polymérases dépendantes du DNA.

L'actinomycine C_1 (ou D) et la proflavine (dérivé d'acridine) sont connues pour se lier au DNA à double hélice et former des complexes caractérisés (WARING, 1968); l'intercalation des molécules de colorant provoque un blocage des propriétés



ACTINOMYCINE C_1 (D)

Fig. 24 - Structure de l'actinomycine D

thr : thréonine
val : valine
pro : proline
sar : sarcosine
méval : mévalonine

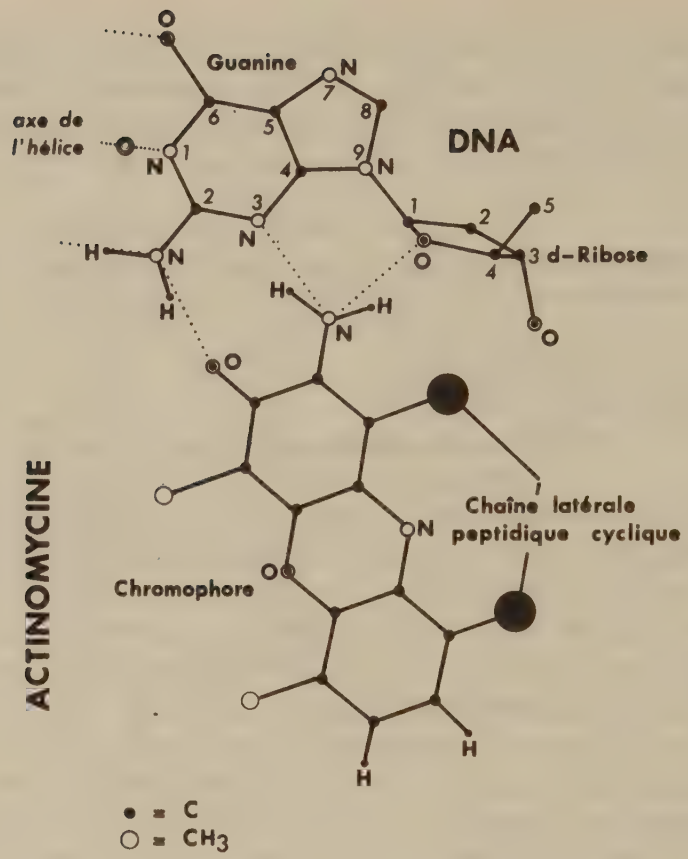
de matrice du DNA et inhibe sa copie par les RNA-DNA dépendant polymérases. Dans ce contexte, il était intéressant de comparer l'action de ces deux antimétabolites sur l'élongation cellulaire, contrôlée par l'AIA, et sur la biosynthèse du RNA.

2. Actinomycine D et Proflavine: caractéristiques

2.1 Actinomycine D

2.1.1 Structure et liaison au DNA natif

Les actinomycines synthétisées par différents genres d'actinomyces forment une famille d'antibiotiques très apparentés dont le plus connu est l'actinomycine C_1 ou D (fig.24) (abbr. act.D). Sa structure comprend 2 pentapeptides cycliques (lactones) portés par un chromophore à 3 cycles conjugués (phénoxazone). L'actinomycine se lie spécifiquement au DNA comportant une structure secondaire hélicoïdale, au niveau du groupe aminé libre de la guanine; le degré d'affinité de l'antibiotique est proportionnel au taux de guanine du DNA. Le complexe métachromatique qui se forme est bien déterminé (REICH et GOLDBERG, 1964); sa stabilisation est assurée par des liaisons hydrogène (fig.25). HAMILTON et al. (1963) ont proposé un modèle moléculaire de la fixation de l'actinomycine D sur le DNA natif (fig.26); ce modèle repose sur les données physico-chimiques établies et rend compte des propriétés biologiques de l'antibiotique. On voit que le chromophore s'attache à un seul des brins matriciels, par l'intermédiaire d'un résidu guanidique et de l'oxygène du désoxyribose; les 2 chaînes peptidiques (stabilisées par leur pont lactone) se disposent à l'intérieur de la double hélice et encombrent partiellement le brin de DNA opposé au site de fixation. On distingue encore des liaisons préférentielles, biologiquement importantes (1 site



INTERACTION (Liaisons hydrogéne) ENTRE LA D-GUANOSINE DU DNA ET L' ACTINOMYCINE

Fig. 25 - Géométrie de 3 des liaisons hydrogène entre le chromophore et la désoxyguanosine. Les cycles lactone stabilisent les chaînes peptidiques, et leur permettent de créer 4 liaisons H entre les amino peptides et l'oxygène du groupe phos - phodiester du brin de DNA opposé à celui qui contient la guanine liée au chromophore.

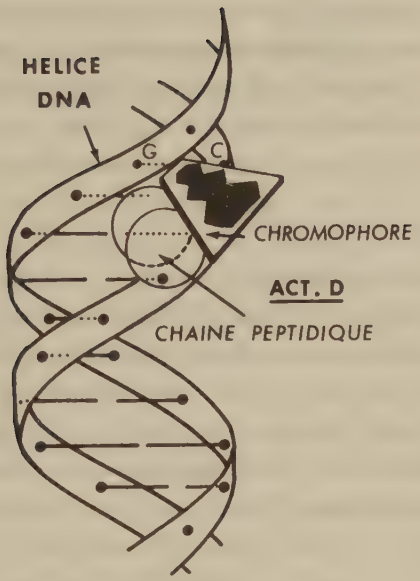


Fig. 26 **PRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REACTION ENTRE DNA-ACTINOMYCINE**

pour environ 14 nucléotides) et des liaisons secondaires, à faible énergie, qui ne se forment que pour des concentrations élevées de colorant. Un modèle plus récent -introduit par MÜLLER et CROTHER (1968)- serait en faveur de l'intercalation du chromophore dans un site adjacent à la paire de bases Guanine-Cytosine. En fait, la nature exacte du complexe reste encore en discussion.

2.1.2 Propriétés biologiques

L'actinomycine D a une forte activité bactéricide, des effets anti-tumoraux puissants, une action anti-virale partielle (sur les virus à DNA et certains virus à RNA comportant une phase de leur réplication dépendante de DNA de la cellule-hôte) et des propriétés anti-mutagèniques. Cet antibiotique est bien connu pour bloquer "in vivo" la synthèse des RNA dirigée par le DNA matriciel (et plus spécialement les RNA transitoires, à courte durée de vie, comme les m-RNA; REICH et al., 1961). "In vitro", on a montré que l'actinomycine D, à faible concen - tration, inhibe fortement la RNA-DNA dépendant polymérase EC 2776 (GOLDBERG et RABINOWITZ, 1962; GOLDBERG et al., 1962; HURWITZ et al., 1963) alors que la DNA-polymérase EC 2777 reste active. Cette dernière enzyme peut être inhibée (avec pour conséquence l'arrêt de la duplication du DNA et le blocage des mitoses), mais pour des teneurs en antibiotique nettement plus importantes que les précédentes (REICH et GOLDBERG, 1964).

Ces effets différents s'expliquent de la façon suivante: L'actinomycine D n'inhibe pas directement l'activité de la RNA-polymérase; en fait, il s'agit d'une interférence stérique. Elle est provoquée par l'encombrement des molécules de colorant localisé sur la portion du DNA "lue" par l'enzyme et qui entravent sa progression. Par contre, on peut penser que la DNA-polymérase, au cours de la duplication, fonctionne sur une surface de la matrice non obstruée par l'inhibiteur. L'inactivation de cette

enzyme pour des doses importantes d'actinomycine D ne serait plus due à une contrainte stérique mais résulterait d'altérations physiques au niveau de la molécule de DNA (augmentation de la température de demi-fusion T_m indiquant une stabilisation des 2 brins matriciels). L'impossibilité physique d'une séparation des brins (mécanisme obligatoire pour la duplication) conduit au blocage de l'activité DNA-polymérasique.

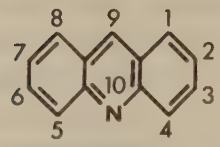
L'actinomycine D a permis de résoudre ou d'étudier de nombreux problèmes: origine des différents RNA, leur transfert du noyau au cytoplasme; sort et durée de vie des m-RNA,- mécanisme d'action des hormones,- développement embryonnaire et différen - ciation cellulaire,- réplication des virus. On l'utilise aussi comme immuno-suppresseur ou pour distinguer les activités enzymatiques constitutives ou induites. Ces larges possibilités d'application font de l'actinomycine un des "outils biochimiques" les plus souvent utilisés.

2.2 Dérivés d'acridine - la Proflavine

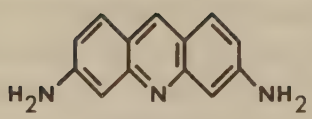
2.2.1 Complexe avec les acides nucléiques

Les acridines sont caractérisés par une structure généralement plane; ils dérivent d'un noyau de base à triple cycle conjugué (dibenzopyridine) et diffèrent entre eux par la composition de leur chaîne latérale (fig.27). Certaines propri - étés des acridines et plus particulièrement de la proflavine (diamino 3,6 acridine) sont bien connues: action mutagène (ORGEL et BRENNER, 1961), anti-bactérienne (ALBERT, 1951) et anti-virale (FRANKLIN, 1958). Elles peuvent s'expliquer notamment par la liaison "in vivo" des acridines aux acides nucléiques; cette interaction est à la base de certaines réactions histolo - giques (DE BRUYN et al., 1953): la fluorescence induite est différente suivant la structure secondaire de l'acide nucléique (1 ou 2 brins); ce changement est directement lié au nombre de molécules du colorant qui sont fixées. "In vitro", la structure

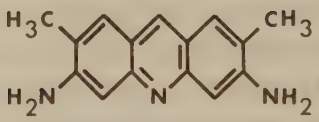
Fig. 27 DERIVES DE L'ACRIDINE



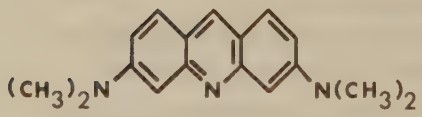
ACRIDINE
2,3:5,6 Dibenzopyridine



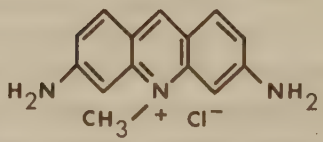
PROFLAVINE
Diamino 3,6 acridine



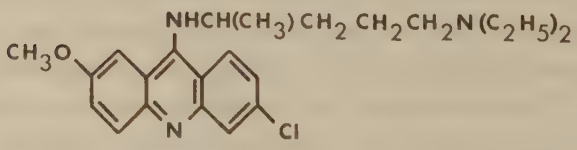
JAUNE D'ACRIDINE
Diamino 3,6 diméthyl 2,7 acridine



ORANGE D'ACRIDINE
Tétraméthyldiamino 3,6 acridine



ACRIFLAVINE ou TRYPAFLAVINE
Chlorure de diamino 3,6 méthyl 10 acridinium



ATEBRINE

du complexe métachromatique réalisé entre les acridines et le DNA (ou le RNA) a été précisée en particulier par BLACKE et PEACOCKE (1965) et WARING (1968).

La biosynthèse du RNA est inhibée par la proflavine (SCHOLTISSEK et ROTT, 1964; WATTS et DAVIES, 1966; CONDE et al., 1971). Ainsi, la fixation de proflavine sur le chromosome bactérien d'E.coli conduit à une rapide réduction de la formation du RNA dirigée par le DNA matriciel (WOESSE et al., 1963). "In vitro", la proflavine diminue l'activité de la RNA-DNA dépendant polymérase (GOLDBERG et al., 1962; HURWITZ et al., 1962). Son effet est comparable à celui de l'actinomycine D (GOLDBERG et al., 1962 et 1963) mais pour des concentrations relatives plus importantes. Cependant, et contrairement à l'actinomycine, la proflavine inhibe rapidement l'activité de la DNA-polymérase (HURWITZ et al., 1962). L'activité inhibitrice des acridines s'explique en partie par leur mode de liaison au DNA.

2.2.2 Le processus d'intercalation

Les dérivés d'acridine (de même que les phénanthridines, comme le bromure d'éthidium) se lient aux acides nucléiques par intercalation. L'étude de la fixation de proflavine au DNA natif par LERMANN (1961 et 1962) a montré que deux types de complexe étaient susceptible de se réaliser:

- le premier type, à forte énergie, résulte de l'intercalation des molécules de proflavine entre 2 paires de bases voisines, sur un plan parallèle à celui des bases, donc perpendiculairement à l'axe de la double hélice; cette dernière subit alors des extensions et des déformations localisées. La saturation de ce type de liaison est atteinte avec 1 molécule de colorant pour 5 nucléotides.

L'intercalation de la diamino acridine modifie sensiblement les propriétés physico-chimiques du DNA récepteur:

la distance normale séparant 2 paires de bases adjacentes

est doublée. L'angle de rotation de l'hélice doit être réduit, entre les paires de bases concernées, pour fournir l'espace nécessaire à l'intercalation des molécules de colorant. L'angle de détorsion est de 36° avec la proflavine (12° avec le bromure d'éthidium).
Variations des propriétés hydrodynamiques: augmentation de la viscosité due à l'élongation de la molécule de DNA; dimi - nution de la constante de sédimentation.
Comme d'autres ligands, les acridines stabilisent fortement la structure hélicoïdale contre la dénaturation thermique (augmentation du T_m).

- le second type de liaison, à faible énergie, résulte d'une interaction d'origine électrostatique entre les molécules d'acridine chargées positivement et les ions phosphate du squelette désoxyribose-ester phosphorique. Ce type de liaison n'est réalisé que pour de très hautes concentrations de colorant; Les molécules d'acridine se disposent le long du DNA et à l'exté - rieur de l'hélice. Le maximum d'empilement (stacking) est atteint avec 1 molécule d'acridine par groupe phosphate.

A chacun des 2 types de liaison est associé un déplacement caractéristique du maximum d'absorption du colorant.

Bien que la position des acridines dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice soit admise, leur localisation relative par rapport aux bases reste incertaine; dans le modèle original de LERMANN (1964) l'acridine est recouverte par les paires de bases (fig.28 A,B et C). PRITCHARD (1966) attribue au colorant une position excentrique et les interactions ne seraient limitées qu'à un seul des brins de DNA (fig.28 D).

La liaison des acridines par intercalation est au maximum de son efficacité pour un DNA hélicoïdal; leur affinité pour les nucléohistones est plus faible (probablement par diminution de l'énergie électrostatique libre). L'interaction décroit en fonction inverse de la force ionique du milieu (contrairement au complexe act.D-DNA qui n'est sensible qu' à l'urée). Certaines combinaisons de bases (adénine et thymine, entre autres) favo - risent le processus d'intercalation.

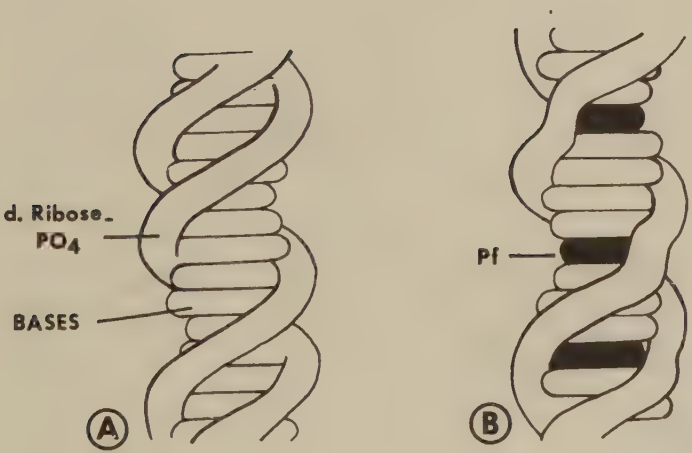
Fig. 28 - Interactions entre proflavine et DNA natif

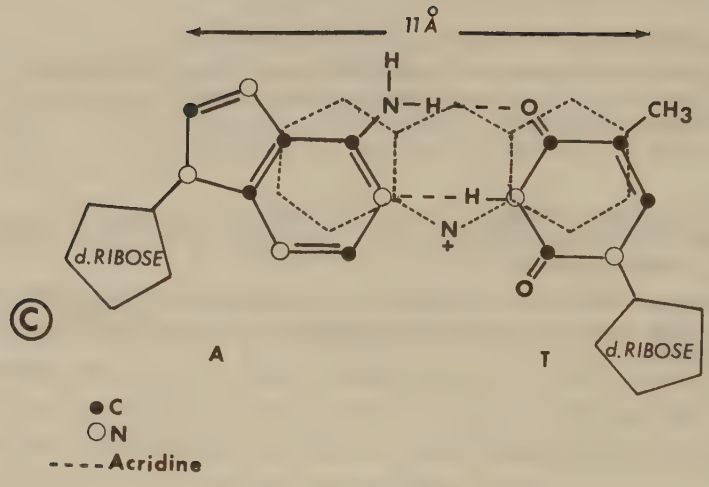
A Structure du DNA normal (vue latérale).

B Structure du même DNA, mais contenant des molécules de proflavine (en noir) intercalées, selon le modèle de LERMAN (1964).

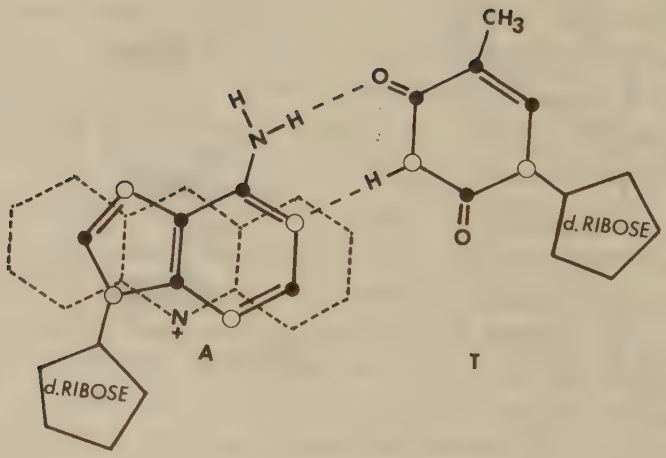
C Position relative du noyau acridine et une paire de bases (adénine-thymine) dans le modèle d'intercalation de LERMAN (1964).

D Position relative du même noyau acridine et de la base purique dans le modèle d'intercalation de PRITCHARD et al. (1966).




11 Å
H
N–H - - O
CH3
- - - H
N+
d. RIBOSE
O
d. RIBOSE
A
T
●C
○N
- - - - Acridine

Ⓒ


CH3
O
H
N–H - - -
H
O
d. RIBOSE
N+
A
T
d. RIBOSE

Ⓓ

La proflavine se lie aussi aux RNA (ou à des polymères synthé - tiques) proportionnellement à leur degré de conformation en double hélice. A fortes concentrations du colorant les acides nucléiques monocaténaires ou dénaturés fixent les molécules d'acridine en plus grande quantité que celle prévue par la structure hélicoïdale, probablement par le second type de liaison (sur les groupes phosphate).
La proflavine et les acridines en général bloquent la duplication du DNA en augmentant l'énergie requise pour séparer les deux brins matriciels. Concernant la biosynthèse du RNA, les acridines diminuent le nombre de sites nécessaires à la fixation de la RNA-polymérase ou bloquent la progression de cette enzyme.
Les acridines inhibent rapidement la synthèse du m-RNA (au début de la transcription, c'est-à-dire durant l'initiation des nouvelles chaînes de m-RNA) et la synthèse inductive d'enzymes.

Le processus d'intercalation est biologiquement important. C'est une hypothèse sérieuse pour expliquer l'activité des molécules planes aromatiques susceptibles de se lier au DNA (anthracènes, anthraquinones, les hydrocarbones carcinogèniques, la tryptamine etc). L'activité de certaines substances anti-plasmodia (Chloroquinine et quinacrine) ou d'antibiotiques (anthracyclines) est concernée par ce mécanisme d'action.

3. Matériel et méthodes

3.1 Elongation

3.1.1 Effet "in vivo" des dérivés d'acridine

Matériel végétal: sections d'épicotyle de Pois S_0 (5 mm de long) dont les caractéristiques ont été discutées dans le chapitre précédent (chap. V-2.).

Traitement par les acridines:

Lots témoins (TE): les sections fraîchement récoltées et lavées sont déposées dans 5 ml de tampon phosphate 0,02 M;pH 6,1- 2% saccharosé.

Lots traités (TR): on incorpore au milieu précédent de la proflavine (sulfate de proflavine, CALBIOCHEM.) ou de l'acridine orange (BDH Chemicals), en solution aqueuse tamponnée à pH 6,1 et conservée à l'abris de la lumière. Leur concentration finale varie de 50 à 1'000 µg/ml de milieu.

Si on procède simultanément à un traitement par l'AIA, sa concentration finale est de 10^{-6}M.

Dans tous les cas, on utilise 2 lots de 15 sections chacun par essai. Au cours du traitement (22 heures), le milieu est agité et thermostaté (25°C ± 0,2°C). Toutes les opérations se déroulent à l'obscurité ou sous lumière verte. La longueur finale des sections (à 0,02 mm près) et déterminée comme indiqué au chapitre II- .).

3.1.2 Cinétique de l'élongation en présence de proflavine ou d'actinomycine D.

Les essais sont réalisés comme ci-dessus, mais les élongations sont mesurées toutes les 90 min, pendant les 7 premières heures (procédé photographique utilisé: cf. chap. II- .).

Les milieux de traitement contiennent:

a/ - 50 ou 200 µg de proflavine par ml.

b/ - 10 ou 20 µg d'actinomycine D (Feinbiochimica SERVA).

c/ - lorsque l'AIA est incorporé au milieu, sa concentration finale est de 10^{-6}M.

3.2 Pénétration de la proflavine dans les tissus

3.2.1 Traitement

30 sections S_0 sont déposées dans 5 ml de milieu (tampon phosphate 0,02 M;pH 6,1 - 2% saccharosé) contenant 50 à 1'000 µg de proflavine par ml. L'incubation est réalisée comme précédemment (25°C, agitation et obscurité). Après des temps déterminés (30, 60, 120, 162 et 300 min), on prélève 5 sections par lot. On les lave rapidement par de l'eau bidistillée à 2°C (3 min); le colorant contenu dans les tissus est extrait puis dosé quantitativement par spectrophotométrie.

3.2.2 Extraction de la proflavine

Les sections sont broyées dans un mortier en présence de sable de quartz puis homogénéisées dans 5 ml de solution aqueuse d'acétone (75%) à 0°C. L'homogénat est placé dans un tube à centrifuger et sa température abaissée à -7°C pendant 2 hr (précipitation des protéines). On laisse reposer 24 hr à 2°C, puis on centrifuge (18'000 x g; 20 min; 2-4°C). Le précipité résultant est lavé par 2 ml de solution acétonique. Après centrifugation (mêmes conditions que plus haut), les 2 surnageants sont collectés. Une prise de cette solution, convenablement diluée, servira aux mesures spectrophotométriques.
Des lavages plus poussés du culot par d'autres solvants organiques (éther, chloroforme, méthanol) ont été effectués après l'extraction par l'acétone; ils ne permettent pas d'extraire d'avantage de proflavine.

3.2.3 Dosage de la proflavine

Une solution acétonique (75%) de proflavine pure montre un pic d'absorption caractéristique dans la région du spectre visible compris entre 400 et 500 nm, avec un maximum à 455 nm. La proflavine extraite des tissus végétaux par le même solvant possède un pic identique (fig.29); on la dose quantitativement par mesure de la DO à 455 nm. Les valeurs sont déduites d'une courbe standard (fig.30).

3.3 Incorporation d'uridine ^{14}C et traitements

3.3.1 Marquage et traitement simultané

20 sections d'épicotyle sont déposées dans 3 ml de tampon phosphate 0,02 M;pH 6,1 -2% saccharosé, contenant 0,8 uCi/ml d'uridine-2 ^{14}C (activité spécifique: 62 mCi/mM) et des concentrations croissantes de proflavine. Après 4 hr de traitement, les sections sont lavées (eau bidist.) et plongées dans 50 ml de tampon phosphate à 2°C pendant 30 min.(agitation intermittente). On les sèche puis on les lyophilise. On procède alors à l'extraction des substances acido-solubles à froid (AS) et du RNA.

3.3.2 Marquage préalable suivi du traitement

Une première étape consiste à incuber les sections en présence du précurseur seul (uridine-^{14}C: 1 μCi/ml de milieu); la durée du marquage est de 165 min. On lave ensuite les sections par de l'eau bidist. (25°C, 15 min) puis, dans une seconde étape, on les place dans 3 ml de tampon phosphate saccharosé contenant des concentrations croissantes de proflavine. Une expérience parallèle est réalisée en remplaçant l'acridine par de l'actinomycine D. Après 4 hr de traitement, les sections sont lavées, séchées et lyophilisées. On procède ensuite à l'extraction des AS et du RNA.

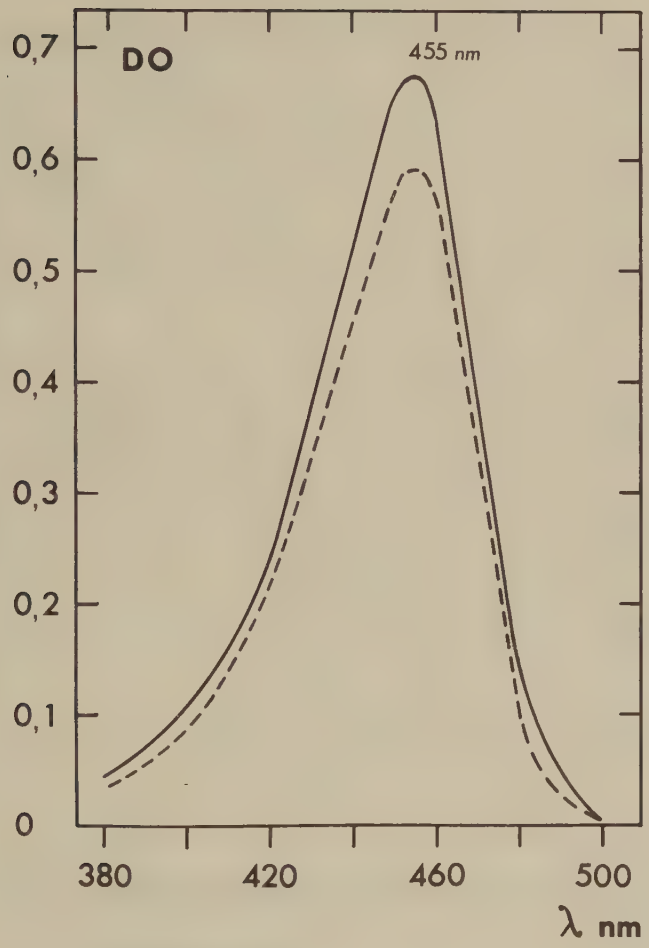


Fig. 29 - Spectre d'absorption de la proflavine
—— proflavine pure; --- proflavine extraite des tissus traités (solvant: acétone 70 %).

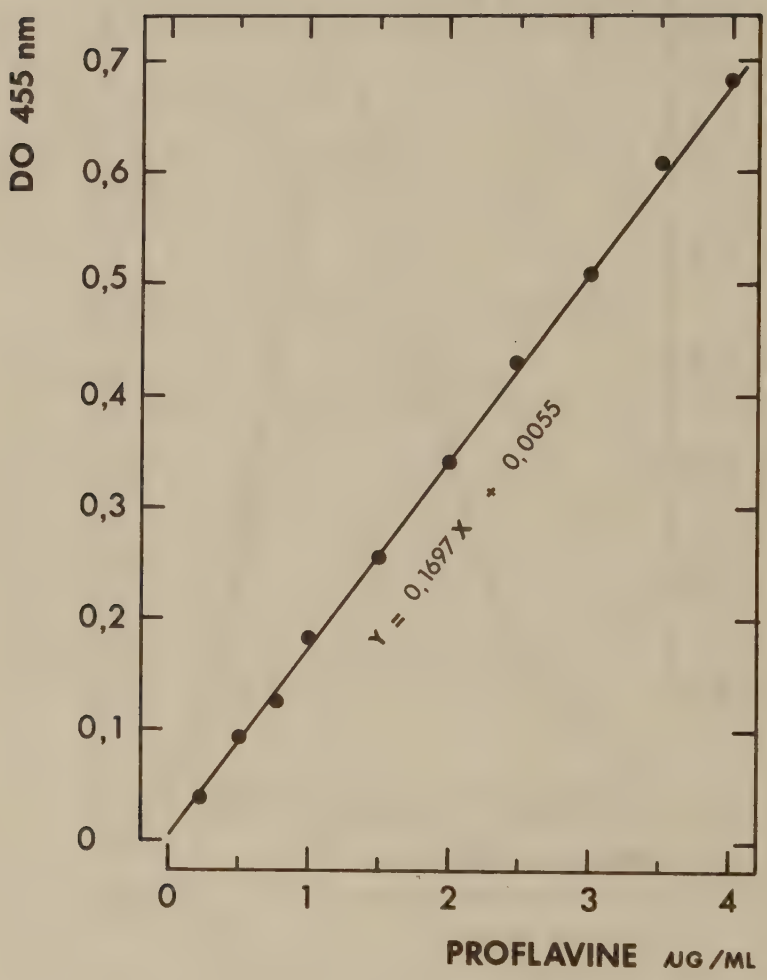


Fig. 30 - Courbe standard de la proflavine

3.4 RNA et substances acido-solubles

3.4.1 Extraction

La technique d'extraction utilisée a été décrite au chapitre III (3.1); quelques modifications ont été apportées dans la nature des solvants organiques employés dans les lavages du culot, après précipitation à l'acide trichloracétique. L'utilisation d'acétone est indispensable pour éliminer la proflavine des tissus.

Le matériel (200 à 400 mg PF) lyophilisé est broyé puis homogénéisé dans 6 ml d'ATC 10%, à 0°C. Après centrifugation (15 min; 16'000 x g; 2°C), le culot est lavé par 6 ml d'ATC 5%. Les 2 surnageants acides sont collectés et constituent la fraction acido-soluble (AS). Le culot est repris par de l'éthanol 90% saturé en acétate de sodium (2 X) puis extrait successivement (15 min; 23°C) par: acétone 90% (2 X), acétone 95% (2 X), mélange éthanol 95%-chloroforme-éther (2:1:1 en v/v) 2 X et éther (2 X). Le résidu séché sous vide est hydrolysé par KOH 0,4 N (18 hr;37°C). La suite du processus d'extraction est identique à celle déjà mentionnée (chap. III-3.1). On aboutit finalement à une fraction RNA qui est un mélange des ribonucléotides mono phosphate.

3.4.2 Mesure de la radioactivité incorporée

Les mesures de radioactivité s'effectuent sur:

- La fraction acido-soluble (AS)
- La fraction correspondant au RNA
- La solution de traitement (uniquement dans le cas du marquage préalable (cf: 3.4.2), à la fin des 4 hr de traitement par la proflavine ou l'actinomycine D.

Pour le comptage par scintillation liquide (chapitre V-2.2.2), 0,1 à 0,2 ml de solution correspondant aux différentes fractions sont mélangés à 15 ml du réactif scintillant; le nombre de cpm est transformé en nombre de dpm après calcul du rendement (80%).

3.5 Chromatographie sur couche mince de PEI-cellulose

On sépare facilement l'uridine et l'uracile des dérivés

phosphatés de l'uridine (UMP,UDP et UTP) par chromatographie sur couche mince de PEI-cellulose (chap.V-4.), en utilisant comme solvant de l'eau déionisée. L'uracile et l'uridine migrent et se séparent tandis que les nucléotides, adsorbés sur l'échan - geur d'anions, restent sur la ligne de départ. La solution de traitement (cf. 3.4.2) a été chromatographiée selon cette technique pour localiser la radioactivité décelée; 20 à 50 µl de cette solution concentrée sont déposés sur la couche mince. Après développement et détection des substances (uv, 254 nm), on mesure la radioactivité le long du chromatogramme (chap.V-4.2.).

4. Résultats et discussion

4.1 Elongation

4.1.1 Effets de la proflavine et de l'acridine orange

Deux séries d'expériences sont réalisées: un traitement par la proflavine (Pf) ou l'acridine orange (AO), à des concentrations croissantes (50 à 1'000 µg/ml); un traitement identique, mais en présence d'AIA. L'élongation absolue des sections, après 22 hr d'incubation, est reportée dans le tableau 20; l'élongation relative (exprimée sous forme de % de stimulation ou d'inhibition) apparait dans la fig.31.

La proflavine et l'acridine orange seules ont un effet inhi - biteur incontestable; l'efficacité de la proflavine est supérieure à celle de l'acridine orange. Le taux d'inhibition augmente avec la concentration des acridines dans le milieu, mais sans qu'il y ait stricte proportionnalité. L'AIA seul stimule nettement l'élongation; cet effet positif persiste en présence des 2 dérivés d'acridine, bien qu'il soit sensiblement diminué.

TABLEAU 20

ELONGATION DES SECTIONS D'EPICOTYLE DE POIS APRES TRAITEMENT PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE PROFLAVINE (Pf) OU D'ACRIDINE ORANGE (AO), AVEC OU SANS AIA.

Lf: longueur finale des sections en mm (plus l'écart-type); longueur initiale (Li): 5 mm; les concentrations d'inhibiteurs sont en µg/ml. Durée du traitement: 22 h.

	µg/ml	AIA 10^{-6}M	Lf	±
+Pf	0	-	7,28	0,06
		+	8,47	0,07
	50	-	6,73	0,06
		+	7,73	0,05
	200	-	6,34	0,07
		+	7,14	0,04
	500	-	5,90	0,05
		+	6,37	0,06
	1 000	-	5,41	0,04
		+	5,86	0,06
+AO	0	-	7,26	0,06
		+	8,51	0,04
	50	-	7,13	0,08
		+	7,89	0,05
	200	-	6,81	0,09
		+	7,47	0,08
	500	-	6,45	0,06
		+	7,10	0,08
	1 000	-	6,08	0,07
		+	6,73	0,06

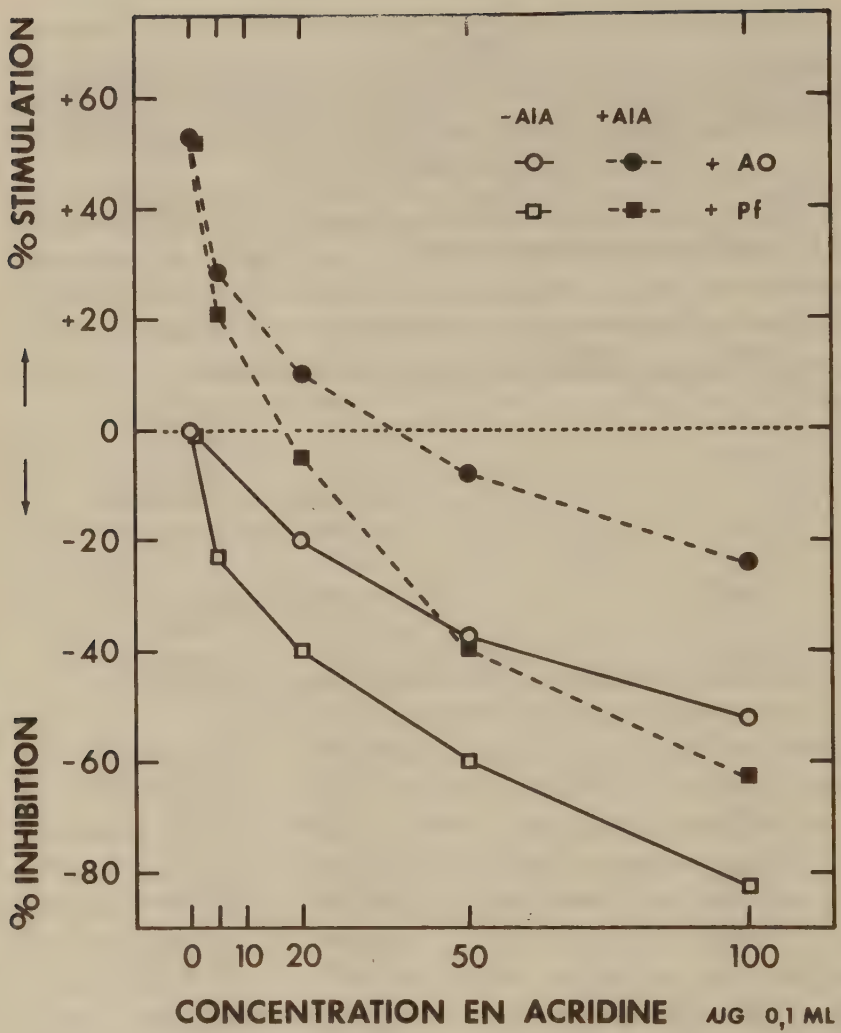


Fig. 31 - Effets de la proflavine (Pf) ou de l'acridine orange (AO) sur l'élongation de sections d'épicotyle, stimulée ou non par l'AIA

concentration des acridines en µg/0,1 ml de milieu; l'AIA est à la concentration finale de 10^{-6}M. L'élongation relative, en %, correspond à une stimulation lorsqu'elle est positive, à une inhibition lorsqu'elle est négative.

4.1.2 Cinétique de l'élongation: influence de la proflavine et de l'actinomycine D

a/ Proflavine.- Les sections S_0 sont traitées par la proflavine (50 et 200 µg par ml de milieu), avec ou sans AIA, dans les conditions précédentes. L'élongation est mesurée toutes les 90 min, pendant les 7 premières heures. Les courbes cinétiques obtenues (fig.32) montrent plusieurs faits:

- la proflavine seule a un net effet inhibiteur dont l'amplitude augmente avec sa concentration dans le milieu.
- cet effet ne se manifeste visiblement qu'après un temps de latence (estimé a environ 1,5 hr).
- l'AIA seul stimule fortement l'élongation endogène; son action paraît immédiat, en première estimation.
- cette stimulation de l'auxine n'est pratiquement pas modifiée par la proflavine, du moins pendant la première 1,5 hr (ce qui correspond au temps de latence de la proflavine).
- le délai mis par la proflavine pour diminuer l'élongation endogène ou stimulée par l'AIA est indépendant de la concentration de l'acridine dans le milieu.

Pour éclaircir ce dernier point, il était indispensable de mesurer la pénétration de la proflavine dans les tissus; en effet, le taux exogène n'est pas forcément lié à la concentration interne. La fig.33 montre la pénétration de la proflavine dans les sections au cours du temps et pour des concentrations exogènes croissantes. On en déduit que la proflavine s'accumule rapidement dans les tissus (après déjà 30 min), selon la cinétique classique; sa concentration intracellulaire reste proportionnelle à son taux dans le milieu extérieur. Il est donc évident que le temps de latence observé plus haut n'est pas du à une restriction de la pénétration du colorant.

b/ Actinomycine D.- Les expériences réalisées avec l'actinomycine sont identiques aux précédentes;l'antibiotique est utilisé aux concentrations de 10 et 20 µg/ml. Les courbes

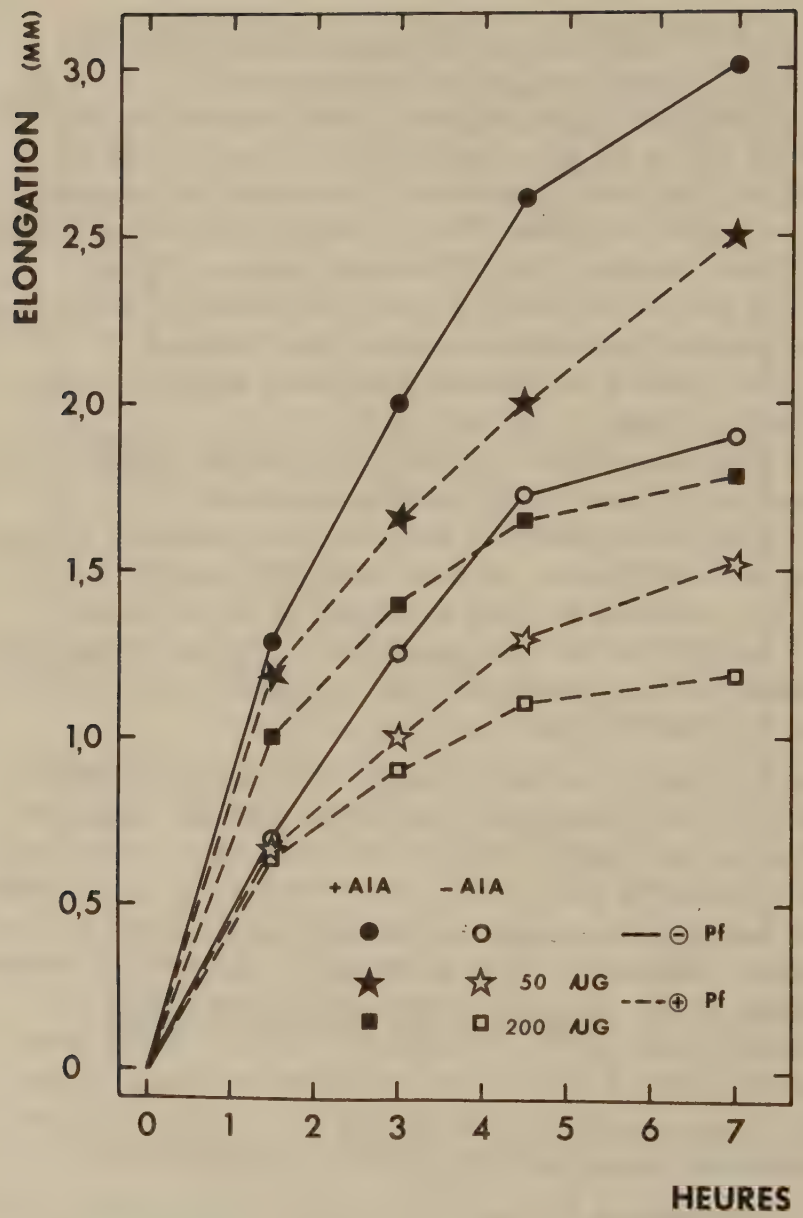


Fig. 32 - Evolution de l'élongation (en mm) des sections d'épicotyle traitées par la proflavine (Pf), en présence ou non d'AIA, au cours du temps

Concentrations en proflavine: 50 et 200 µg/ml; AIA: 10^{-6}M.

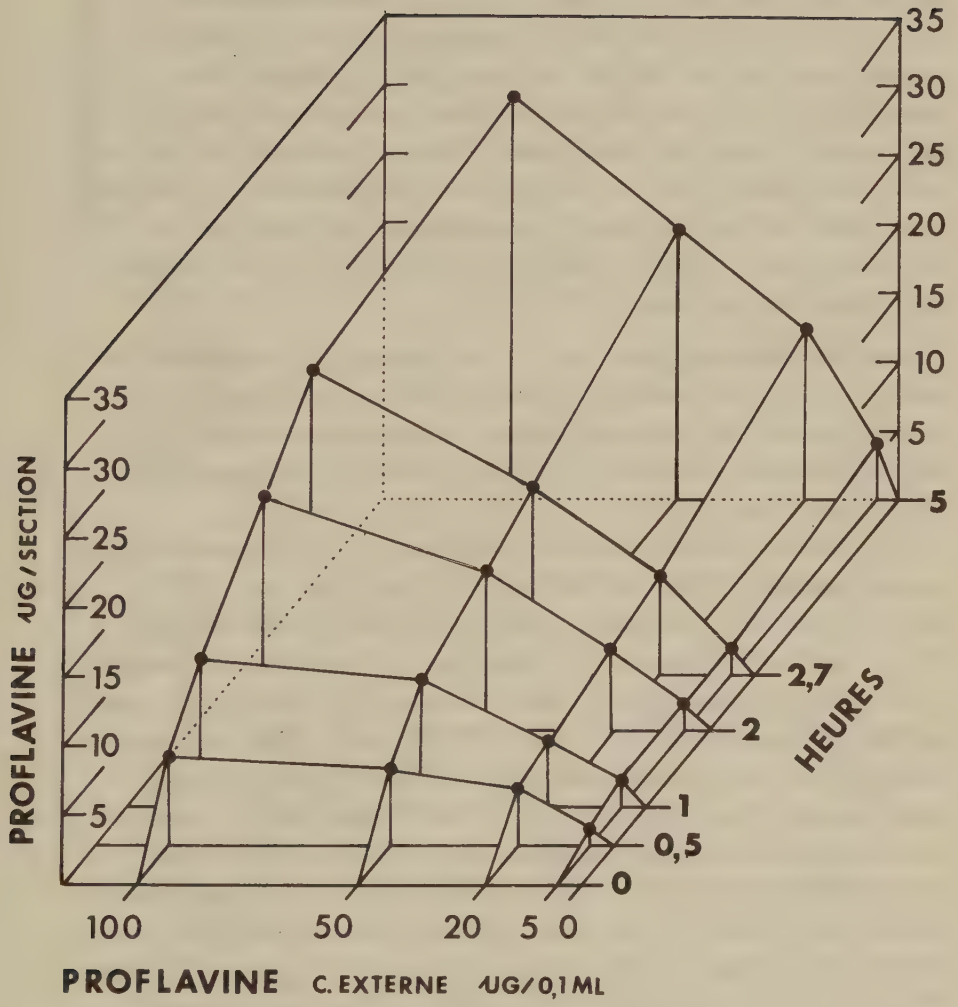


Fig. 33 - Pénétration de la proflavine dans les tissus (µg/section) en fonction de sa concentration externe (µg/0,1 ml) et du temps de traitement (hr).

cinétiques de l'élongation (fig.34) ont la même allure que celles obtenues en présence de proflavine; cependant, l'antibiotique se révèle être un inhibiteur de l'élongation (stimulée ou non par l'AIA) beaucoup plus efficace. Les commentaires suggérés par ces courbes cinétiques seraient identiques à ceux que nous avions faits au sujet de la profla - vine (voir plus haut). Il existe aussi une période de latence avant que l'effet inhibiteur se manifeste; sa durée est de 1,5 hr (comme pour la proflavine) et ne dépend pas de la concentra - tion externe d'actinomycine D.

Ces résultats montrent que la proflavine et l'actinomycine D agissent de façon identique, probablement en bloquant la biosynthèse du RNA, et plus particulièrement celle du m-RNA (ou des espèces apparentées) impliqué dans le processus de l'élongation cellulaire.

L'actinomycine D est connue pour inhiber la croissance des tissus végétaux (PENNY et GALSTON, 1966; KEY et al., 1967; NOODEN, 1968).D'autre part, l'inhibition de la synthèse du RNA par cet antibiotique se traduit par un arrêt de l'élongation et de l'extensibilité de la paroi squelettique, du moins dans certains tissus (COARTNEY et al., 1967); dans d'autres cas, l'élongation est bloquée, mais le relâchement de la paroi (mesurée par l'extensibilité ou la "déformabilité"), stimulé notamment par l'auxine, existe encore (MORRÉ, 1965). Ainsi, pour MORRÉ et EISINGER (1968), certains aspects du relâchement de la paroi squelettique sont impliqués dans le mécanisme de l'élongation, mais il n'existe pas de relations simples entre l'extensibilité totale et l'allongement. Pour ces auteurs, la participation de constituants cellulaires instables (enzymes, complexes particuliers comme les "transformases ou extensases") est indispensable. Ces facteurs cellulaires auraient des durées de vie relatives différentes (de 2 à 5 hr selon les espèces); Ils pourraient, par exemple, fonctionner pendant quelques heures encore avant que leur synthèse (suivant le schéma normal

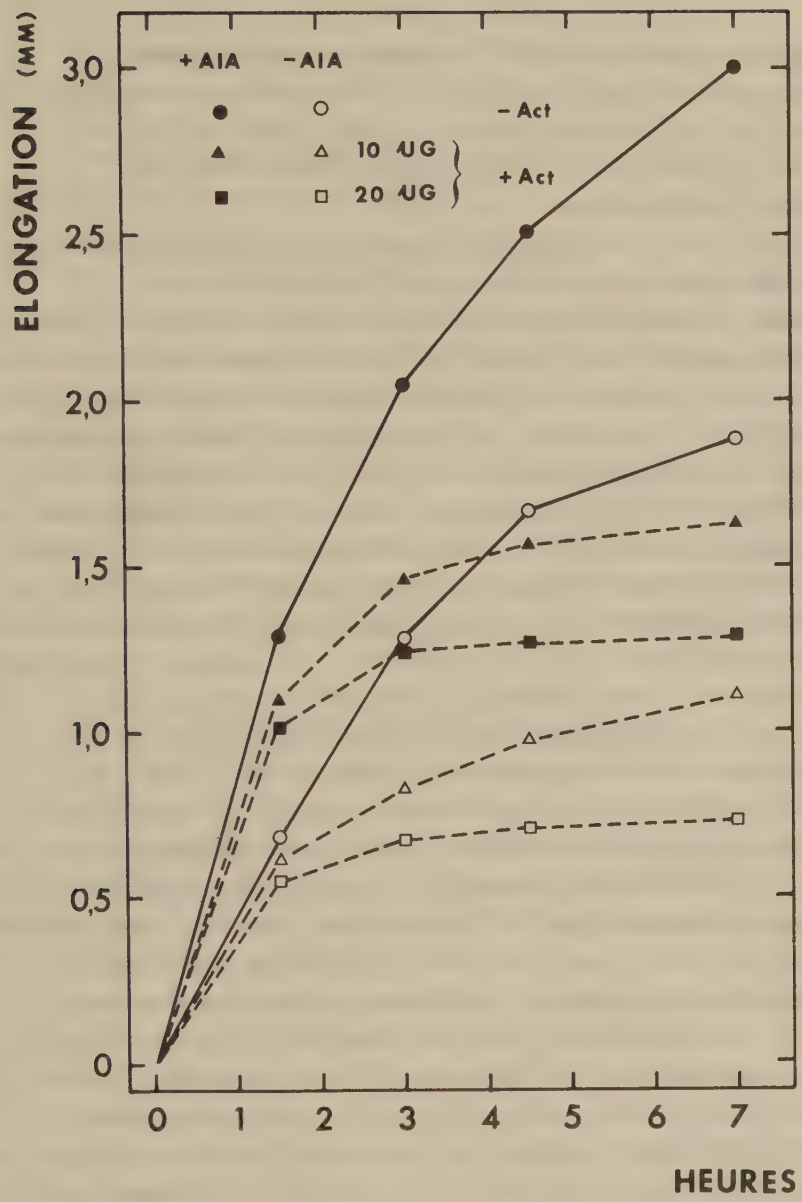


Fig. 34 - Evolution de l'élongation (en mm) des sections d'épicotyle traitées par l'actinomycine D (Act), en présence ou non d'AIA, au cours du temps

Concentrations en actinomycine: 10 et 20 µg/ml; AIA: 10^{-6}M.

transcription-traduction) soit inhibée par un traitement à l'actinomycine D. Celà signifierait, dans notre cas (sections de Pois), que les cellules possèdent assez de m-RNA (ou de protéines) "essentiel à la croissance" pour assurer une élongation normale pendant 1,5 heure.

L'effet stimulateur de l'AIA (avec ou sans inhibiteur) durant ce laps de temps est plus obscure. KEY et INGLE (1968): les auxines augmentent la synthèse de m-RNA particuliers (AMP-rich RNA); selon MASUDA et KAMISAKA (1969), cet effet peut être rapide (13 min environ) et précéder la phase d'élongation proprement dite. Cependant, si les tissus sont prétraités par de la RNase (de façon à détruire ce m-RNA stoqué essentiel (PENNY et GALSTON, 1966), puis incuber en présence d'AIA et d'actino - mycine, on observe encore un temps de latence avant que l'élon - gation soit diminuée; de plus, l'effet stimulateur de l'AIA se produit rapidement, à un taux comparable à celui trouvé dans les tissus non prétraités par la RNase.

En fait, des études cinétiques poussées ont établi que les auxines induisent une stimulation de l'élongation en quel - ques minutes (RAY et RUESINK, 1962; EVANS et RAY, 1969). Cet effet est trop rapide pour se situer au niveau du génome, du m-RNA ou de l'induction d'enzymes spécifiques (la plus courte période de latence pour l'induction d'une enzyme végétale- la nitrate-réductase- est de 2 hr). A part l'auxine, d'autres facteurs non spécifiques (pH acide et CO_2) produisent une stimulation de l'élongation toute aussi rapide que l'AIA et modifient l'extensibilité (RAYLE et CLELAND, 1970). On admet actuellement que l'action rapide de l'AIA se situe au niveau du plasmalemme (HERTEL et al., 1972). Par un mécanisme encore hypothétique (pompe à protons de HAGER et al., 1971), l'AIA favoriserait la libération de H^+ qui pourraient dissocier les liaisons acido-labiles (glycosyl-uronides ou xyloglucane-cellulose) de la paroi ou activer des systèmes de dégradation des constituants de cette paroi.

4.3 Incorporation d'uridine-^{14}C (RNA et fraction AS)

Les deux types d'expériences réalisées sont décrits sous Matériel et méthodes (3.3.).

4.3.1 Marquage et traitement simultané

La radioactivité des fractions RNA et acido-solubles (AS) est représentée dans la fig.35. La synthèse du RNA, mesurée par le taux d'incorporation de l'uridine-^{14}C, baisse rapidement lorsque la quantité de proflavine augmente dans le milieu et se stabilise au-delà de 500 µg/ml. Parallèlement, on constate que la radioactivité de la fraction AS, qui correspond au "pool" des nucléotides libres, diminue, mais pour des concentrations de proflavine supérieures à 50 µg/ml. On peut alors se demander si la synthèse du RNA n'est pas limitée par le marquage de ce "pool", lui-même dépendant de la pénétration du précurseur et de sa phosphorylation.

4.3.2 Marquage préalable suivi du traitement

Afin d'éviter les problèmes liés à la pénétration du précurseur, les sections sont d'abord marquées (165 min), puis traitées par la proflavine à différentes concentrations, après élimination du précurseur. On réalise un traitement identique mais avec de l'actinomycine D,à des doses inhibitrices de l'élongation (10 et 20 µg/ml).

a/ incorporation au niveau du RNA.- La radioactivité du RNA, en présence de proflavine, est reportée dans la fig.36. Elle diminue très rapidement (entre 25 et 200 µg de proflavine) pour atteindre un plateau. L'inhibition de la synthèse en % par rapport au témoin (tableau 21) est au maximum de 54 %, après 4 hr de traitement.

L'actinomycine D inhibe complètement la biosynthèse du RNA, et pour les 2 concentrations utilisées (fig.37 et tableau 21). De plus, la radioactivité finale est inférieure à celle qui

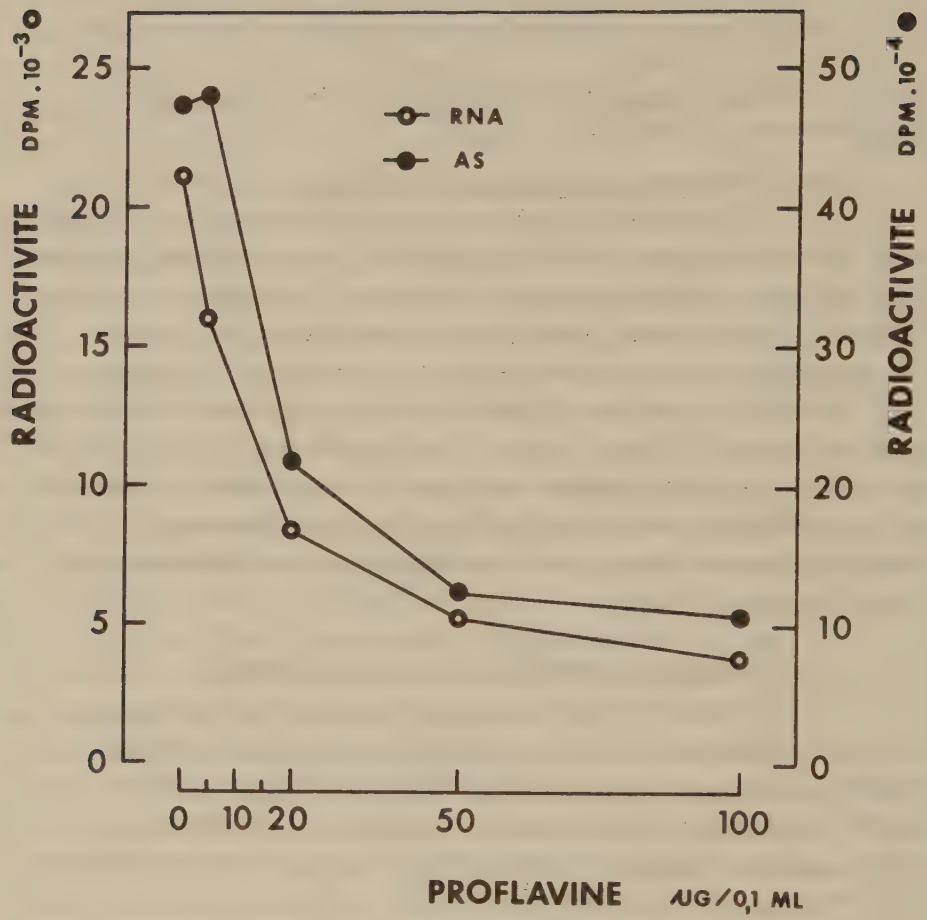


Fig. 35 - Variation de la radioactivité (en dpm pour 20 sections) du RNA et de la fraction acido-soluble (AS) après traitement par différentes concentrations de proflavine (µg/ 0,1 ml).

TABLEAU 21

SYNTHESE DU RNA APRES TRAITEMENT PAR LA PROFLAVINE (Pf) ET L'ACTINOMYCINE D (act.D).

dpm: radioactivité du RNA pour 20 sections.% RNA: variations relatives de la radioactivité des traités par rapport aux témoins.

	µg/ml	dpm	% RNA*	% inhibition
+Pf	0	19 503	100	-
	25	19 732	103,4	(+ 3,4)
	50	17 491	70,2	(- 29,8)
	100	16 391	53,9	(- 46,9)
	150	16 134	50,1	(- 49,9)
	200	16 127	50,0	(- 50,0)
	500	16 094	49,5	(- 50,5)
	1 000	15 857	46,0	(- 54,0)
+act.D	10	11 301	-21,5	(-121,5)
	20	9 593	-46,8	(-146,8)

* % RNA= $dpm(TR)-dpm(TE_o)/dpm(TE)-dpm(TE_o) \cdot 100$

ou TR: radioactivité du RNA des lots traités, à la fin du traitement.

TE: radioactivité du RNA des lots témoins, à la fin du traitement.

TE_o: radioactivité du RNA des lots témoins, au début du traitement; sa valeur est de 12 752 dpm.

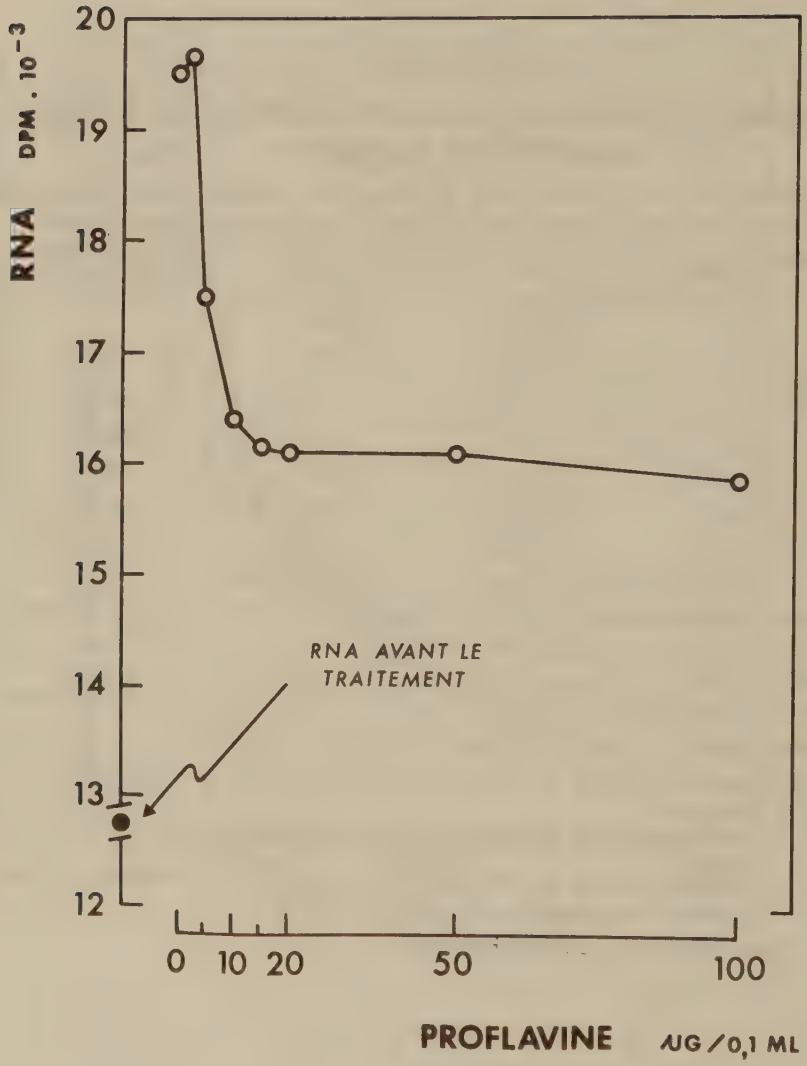


Fig. 36 - Détermination de l'incorporation de l'uridine-^{14}C (en dpm pour 20 sections) dans le RNA pour différentes concentrations de proflavine (µg/0,1 ml), lorsque le traitement (4 hr) suit le marquage.

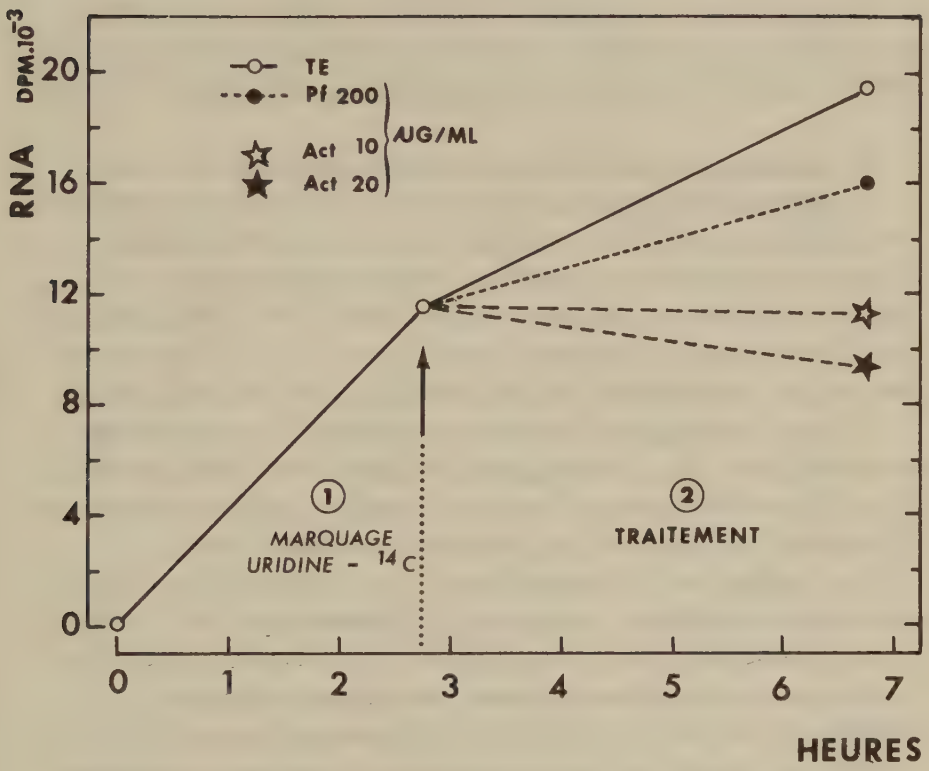


Fig. 37 - Comparaison des variations de la radioactivité du RNA (en dpm/20 sections) après traitement par l'actinomycine (Act) ou la proflavine (Pf), lorsque ce traitement suit le marquage.

Concentration de l'actinomycine: 10 et 20 µg/ ml.
Concentration de la proflavine : 200 µg/ ml.

existait au début du traitement par l'antibiotique; cet effet est probablement du à la dégradation du RNA marqué. En effet, la synthèse du RNA étant bloquée par l'actinomycine D, le RNA préexistant subit un catabolisme intense. On a observé (WOESE et al., 1963; REICH et GOLDBERG, 1964) que dans des bactéries ou des cellules animales traitées par l'actinomycine D, le RNA nouvellement synthétisé est rapidement dépolymérisé.

b/ Radioactivité de la fraction acido-soluble (AS) et du milieu de traitement (ST).- Pour la proflavine, il existe une étroite corrélation (tableau 22) entre la diminution de la radioactivité dans la fraction acido-soluble (AS) et son augmentation dans la solution de traitement (ST); leur évolution reste symétriquement opposée. L'actinomycine D, par contre, ne modifie pas sensiblement la radioactivité dans les deux cas.

La perturbation intracellulaire du "pool" des nucléotides se produit pour des concentrations de proflavine supérieures à 50 µg/ml; ce seuil se retrouve aussi dans la première expérience (fig. 35) où marquage et traitement étaient simultanés.

Pour identifier le composé marqué qui s'accumule dans la solution de traitement, nous avons chromatographié 10 µl de ST sur couche mince de PEI-cellulose. La technique utilisée (voir Matériel et méthodes) permet de séparer l'uridine (Rf: 0,88) de l'uracile (Rf: 0,79); les nucléotides restent sur la ligne de départ. La radioactivité de ST est essentiellement localisée au niveau de l'uridine (fig. 38). C'est donc le précurseur lui-même qui disparaît du "pool" intracellulaire pour se concentrer, par exodiffusion, dans le milieu de traitement.

SCHOLTISSEK et BECHT (1966) ont constaté que l'acridine orange produit un effet semblable sur des cellules d'embryon de poulet et l'attribuaient à une perturbation du transport actif; d'autre part, la proflavine ne modifie pas le métabolisme énergétique de cellules de fibroblastes de poulet (SCHOLTISSEK

TABLEAU 22

RADIOACTIVITE (en dpm) DE LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE (AS) ET DE LA SOLUTION DE TRAITEMENT (ST) EN PRESENCE DE PROFLAVINE (Pf) OU D'ACTINOMYCINE D (act. D).

AS: dpm/20 sections. ST: dpm/3ml. % AS: % de radioactivité par rapport au témoin. % ED: % d'exodiffusion.

	µg/ml	ST	AS	% AS	% ED*
+ Pf	0	7 530	362 070		2,1
	25	7 740	366 239	+ 1,1	2,1
	50	7 900	362 600	+ 0,1	2,1
	100	39 660	301 916	- 16,6	11,6
	150	52 590	275 410	- 23,9	16,0
	200	56 220	270 780	- 26,0	17,2
	500	93 420	233 520	- 35,5	28,6
	1 000	96 130	192 500	- 46,8	33,3
+ act.D	10	8 880	362 890	+ 0,2	2,4
	20	9 690	365 147	+ 0,8	2,6

* % ED = dpm (ST)/ dpm (ST) + dpm (AS) . 100

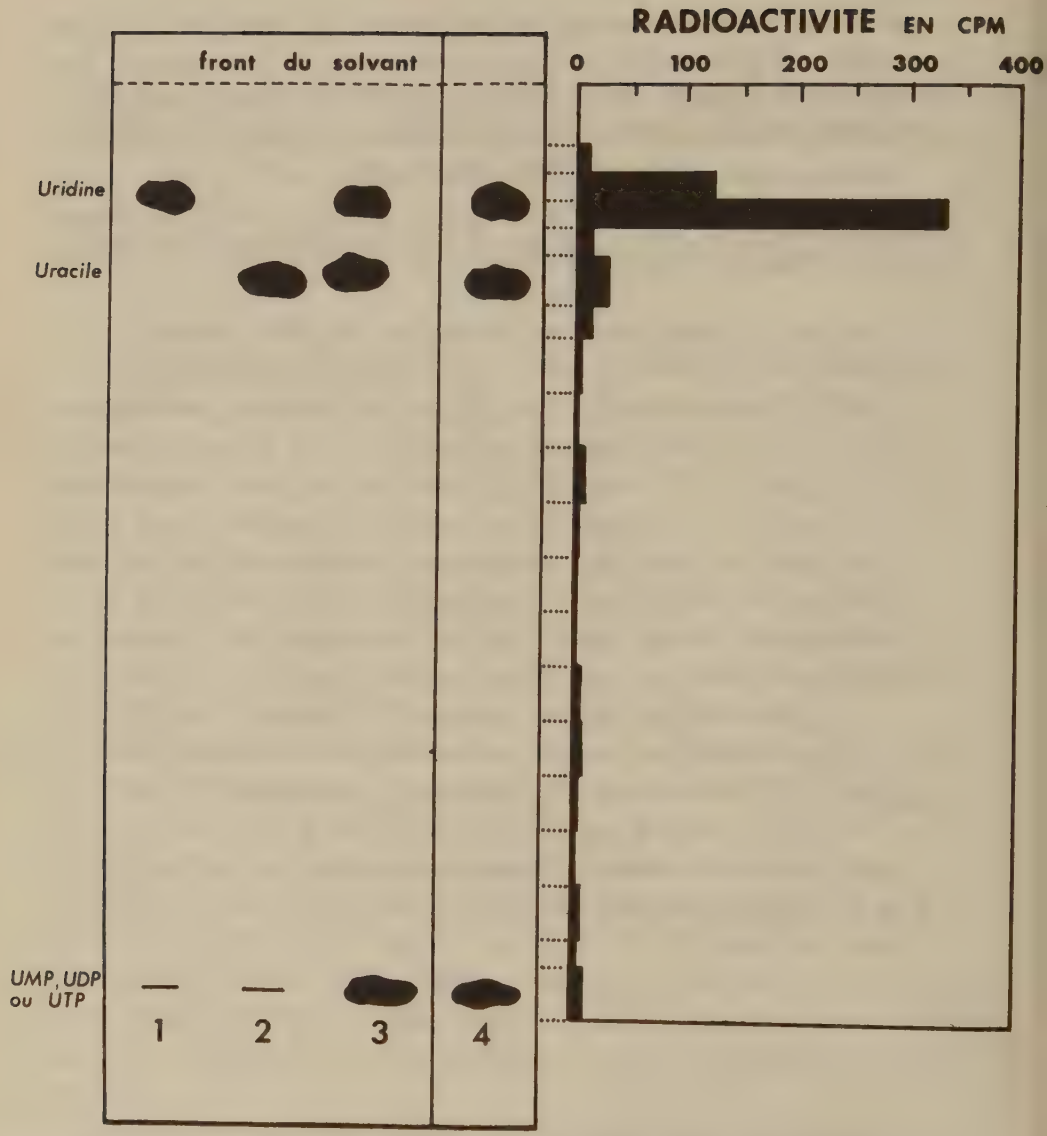


Fig. 38 - Détermination de la substance responsable de la radioactivité dans la solution de traitement (ST) qui contenait la proflavine

Chromatographie sur couche mince de PEI-cellulose; solvant: H_2O avec: 1= uridine; 2= uracile; 3= mélange d'uridine mono, di et triphosphates; 4= solution de traitement concentrée + mélange (1+2+3) servant de porteur. La radioactivité le long du chromatogramme est en cpm.

et ROTT, 1964); par ailleurs, le taux en UTP (lors du marquage par l'uridine) est diminué de 30 %, pour 75 µg de proflavine par ml de milieu. Dans notre cas, la proflavine diminue nettement la radioactivité du "pool" des nucléotides. Il pourrait s'agir soit d'une perturbation de la perméabilité cellulaire, soit d'une inhibition des kinases qui procèdent à la phosphorylation des nucléosides. On sait (PRESCOTT, 1964) que si les bases ou les nucléosides peuvent entrer librement dans les cellules, la pénétration active des nucléotides est lente et peu importante; du fait de cette faible perméabilité, les nucléosides (comme l'uridine), rapidement convertis par phosphorylation en nucléotides (UMP, UDP et UTP) sont efficace - ment retenus à l'intérieur du "pool" cellulaire, même si les cellules sont transférées dans un milieu neuf, sans précurseur. RAU et SCHOLTISSEK (1970) ont montré que l'acridine orange inhibait "in vivo" l'incorporation et la phosphorylation des nucléosides et interfère avec l'activité kinasique; il est très probable que la proflavine agisse aussi de cette façon.

Bien que la proflavine diminue l'incorporation de l'uridine marquée dans le "pool" intracellulaire, on peut cependant mettre en évidence son action inhibitrice sur la synthèse du RNA; en effet, la proflavine, à 50 µg/ml, diminue cette synthèse de 29,8 % alors que la fraction AS n'est pas modifiée. D'autre part, une baisse importante du "pool" (-22,9 %) ne se traduit pas, au niveau du RNA, par une perte aussi importante (-4,1 %). Il est connu que parmi tous les dérivés nucléotidiques seule une petite fraction est impliquée dans la synthèse du RNA. Il apparait, en outre, que la fraction AS limite la synthèse de l'acide nucléique, mais il est impossible de savoir dans quelle mesure. Il conviendrait alors de mesurer plutôt la teneur spécifique en UMP, UDP et UTP que le "pool" entier.

Par ailleurs, la synthèse des protéines est aussi perturbée par la proflavine (SCHOLTISSEK et ROTT, 1964; WATTS et DAVIS, 1966), mais moins fortement que celle du RNA. BOGEN et KESSER

(1954) constatent que des levures traitées par l'acridine orange présentent un intense catabolisme des protéines et une exosmose des acides aminés libérés; En fait, la synthèse protéinique serait bloquée au niveau du RNA et seuls les processus de dégradation seraient actifs.

5. Conclusion

La proflavine et l'actinomycine D inhibent l'élongation endogène des segments excisés d'épicotyle de Pois, après une période de latence de 1,5 hr environ. La stimulation de crois - sance induite par l'AIA est réduite; cette diminution n'est apparente qu'après cette même période de latence qui, par ailleurs, est indépendante de la concentration externe de ces antimétabolites. Parallèlement, la synthèse du RNA, dans ces sections, mesurée par le taux d'incorporation d'uridine-^{14}C, est rapidement diminuée après 4 hr de traitement. On sait que la proflavine (et certains dérivés d'acridine) ou l'actinomycine peuvent se lier au DNA matriciel et bloquer la synthèse de m-RNA; l'actinomycine est connue pour être un inhibiteur beaucoup plus efficace que la proflavine; son effet sur la croissance et la biosynthèse du RNA est nette. Pour la proflavine, par contre, on note des effets secondaires (perturbation du "pool" des nucléotides, de la perméabilité cellulaire ou de l'activité de certaines kinases) à côté de son action inhibitrice sur le RNA. Il existe certainement une relation entre l'effet de ces deux substances sur la croissance (dépendante d'une synthèse continue de m-RNA) et l'inhibition de la biosynthèse du RNA. Il est aussi probable que l'AIA stimule l'élongation cellulaire dans une phase initiale rapide, indépendante du génome et des processus de transcription-traduction.

CONCLUSIONS GENERALES

La région subapicale de l'épicotyle de Pisum est caractérisée par des tissus en phase d'élongation stricte. Les études réalisées in situ, in vivo ou in vitro sur ce matériel nous permettent de mettre en évidence les points suivants:

1° La croissance endogène diminue rapidement de l'apex vers la base. La teneur en RNA des tissus, au début de la phase d'élongation, décroît parallèlement. Enfin, le taux en auxines le long de cette zone (déduit indirectement ou par analogie à certaines expériences de transport sur ce même matériel) baisse aussi rapidement.
Il existe donc dans la zone d'élongation un rapport direct entre la croissance, l'état auxinique endogène et le taux en acide ribonucléique des cellules.

2° Croissance des tissus excisés:
- La biosynthèse du RNA mesurée par l'incorporation d'uridine-2 ^{14}C est, dans ces tissus, proportionnelle à:
  1- leur potentiel de croissance endogène.
  2- leur teneur initiale en RNA.
- Effets de l'acide indole-3-acétique fourni exogènement:
  La stimulation de croissance induite par l'AIA se traduit par une augmentation concomitante du RNA synthétisé (relation directe).

  L'AIA ne modifie ni le mécanisme d'absorption ni celui de l'incorporation du précurseur marqué. Le processus d'anabolisme de l'uridine et celui de son incorporation au RNA sont, par ailleurs, conformes à ceux décrits pour les cellules animales ou végétales et certains micro - organismes.

3° La proflavine (acridine) et l'actinomycine D sont des inhibiteurs de la transcription. Ces antimétabolites inhibent la croissance endogène des tissus excisés, mais après une période de latence (1,5 h environ). La stimulation de l'élongation induite par l'AIA est réduite après cette même latence. L'actinomycine D, par ailleurs, bloque indubitablement la biosynthèse du RNA; la proflavine exerce un effet similaire mais moins marqué (il s'accompagne, pour les concentrations élevées de cette denière, d'une perturbation du "pool" des nucléotides probablement au niveau de la perméabilité cellulaire).
Il existe une corrélation étroite entre l'effet de ces deux substances sur la croissance et l'inhibition de la synthèse du RNA. Il est probable, d'après les latences observées au cours de l'élongation, que l'AIA stimule la croissance très rapidement dans une phase de courte durée, indépendante du génome et des processus de transcription-traduction. Pour une réalisation de la croissance à plus long terme, la biosynthèse du RNA est des protéines est indispensable.

B I B L I O G R A P H I E

ADAMSON D., LOW V.H.K. et ADAMSON H., in Biochemistry and physiology of plant growth substances, p.505, F. Wightman et G. Setterfield éd., The Runge Press, Ottawa (1968)

ALBERT L., in The acridines, E. Arnold & Co éd., Londres (1951)

ALLEN R.J.L., Biochem. J., 34:858 (1940)

ANDERSEN A.S., in Hormonal regulation in plant growth and development, Proc. adv.study inc. Izmir 1971, p.97, H. Kaldewey & Y. Vardar éd., Verlag Chemie, Berlin (1972)

APELBAUM A. et BURG S.P., Plant Physiol., 48:648 (1971)

BLAKE L. et PEACOCKE A.R., Nature, 206:1001 (1965)

BOGEN H.J. et KESER M., Physiol. Plant., 7:446 (1954)

BONNER J. et ZEEVAART J.A.D., Plant Physiol., 37:43 (1962)

BOVÉ J.M. et YOT P., Bull. Soc. Chim. Biol., 47:1286 (1965)

BRIAN P.W., Nature, 181:1122 (1958)

BROWN D.M., FASMAN G.D., MARGRATH D.J., TODD A.R., COCHRAN W. et WOOLFSON M.M., Nature, 172:1184 (1953)

BROWN E.G., Biochem. J., 85:633 (1962)

BURG S.G. et BURG E.A., in Biochemistry and physiology of plant growth substances, p.1275 (1968) cf. Adamson et al.

BURTON K., Biochem. J., 62:315 (1956)

CANELLAKIS E., J. Biol. Chem., 227:329 (1957)

CAVALIERI L.F., J. Am. Chem. Soc., 75:5268 (1953)

CERIOTTI G., J. Biol. Chem., 214:59 (1955)

CLELAND R., in Biochemistry and physiology of plant growth substances, (1968) cf. Adamson et al.

– Ann. Rev. Plant Physiol., 22:197 (1971)

COARTNEY J.S., MORRÉ D.J. et KEY J.L., Plant Physiol., 42:434 (1967)

COHN W.E., in Méthods in enzymology, Vol.3;p.724, S.P. Colowick et N.O. Kaplan éd. (1957)

CONDE F., DEL CAMPON F. et RAMIREZ J.M., FEBS letters, 16:156 (1971)

CRAWFORD A., KORNBER A. et SIMMS E., J. Biol. Chem., 226:1093 (1957)

CROSBIE G., in The nucleic acids, Vol.2;p.324, E. Chrgaff et J Davidson éd. Academic Press (1960)

DAVIDSON J.N., in The biochemistry of the nucleic acids, P. Peters et F.G. Young éd. Methuen & Co LTD, London (1965)

- FRAZER S.C. et HUTCHINSON W.C., Biochem. J., 49:311 (1951)

DAVIS F.F. et ALLEN F.W., J. Biol. Chem., 227:907 (1957)

DE BRUYN P.P.H. FARR R.S. BANKS H. et NORRHLAND F.W., Exp. Cell. Res., 4:174 (1953)

DE DEKEN-GRENSON M. et DE DEKEN R.H.. Biochem. Biophys. Acta 31:195 (1959)

EISENGER W.R. et BURG S.P., Plant Physiol., 50:510 (1972)

ESNAULT R. Thèse (Paris) 1967

EVANS M.L. et RAY P.M., J. Gen. Physiol., 53:1 (1969)

EVANS W. et AXELROD B., Plant Physiol., 36:13 (1961)

FAN D. et MACLACHLAN G.A., Plant Physiol., 42:1114 (1967)

FLETCHER R.A. et OSBORNE D.J., Nature, 207:1176 (1965)

FRANKLIN R.M., Virology, 6:525 (1958)

FRIES N., Physiol. Plant., Physiol. Plant., 13:648 (1960)

FU ASAWA H., Exp. Cell. Res., 25:276 (1963)

GALSTON A.W. et BAKER R.S., Plant Physiol., 26:311 (1951)

- - Am. J. Bot., 40;512 (1953)

- et DALBERG L.Y., Am. J. Bot., 41:373 (1954)

- et DAVIES A.W., Science, 163:1283 (1969)

- - in Control mechanisms in plant devepment C.L. Markert éd. Prentice-Hall Inc. New-Gersey (1970)

- et HAND M.E., Am. J. Bot., 36:85 (1949)

GASPAR T., Ann. Biol., 4:438 (1965)

GOLDBERG I.H. et RABINOWITZ M., Science, 136:315 (1962)

- RABINOWITZ I.H. et REICH E., Proc. Natl. Acd. Sci. USA, 48:2094 (1962)

- REICH E. et RABINOWITZ M., Nature, 199:44 (1963)

HAGER A., MENZEL H. et KRAUSS A., Planta, 100:47 (1971)

HAMILTON L., FULLER W. et REICH E., Nature, 198:538 (1963)

HAMILTON,T.H., MOORE R.J., RUMSEY A.F. et MEANS A.R., Nature, 208:1180 (1965)

HARDIN J.W., CHERRY J.H., MORRÉ D.J. et LEMBI C.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:3146 (1972)

HARE R.C., Bot. Rev., 30:129 (1964)

HERTEL R., THOMSON K.S. et RUSSO V.E.A., Planta, 107:325 (1972)

HEYES J.K., Proc. Roy. Soc.(B), 152:218 (1960)

HOLDGATE D.P. et GOODWIN T.W., Phytochem., 4:831 (1965)

HOLM R.E. et ABELES F.A., Planta, 78:304 (1968)

HOTCHKISS R.D., in Méthods in enzymology, Vol.3 (1957) cf. Cohn W.D.

HURWITZ J., FURTH J.J., MALAMY M. et ALEXANDER M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:1222 (1962)

HUTCHINSON W.C et MUNRO H.N., Analyst, 86:768 (1961)

INGLE J., Phytochem., 2:353 (1963)

JACOB F. et MONOD J., J. Mol. Biol., 3:318 (1961)

KAPOOR M. et WAYGOOD E., Plant Physiol., 36: V (1961)

KEEGSTRA K., TALMADGE K.W., BAUER W.D. et ALBERSHEIM P., Plant Physiol., 51:188 (1973)

KESSLER B. et ENGELBERG N., Biochim. Biophys. Acta, 55:70 (1962)

KEY J.L., Ann. Rev. Plant Physiol., 20:449 (1969)

- BARNETT N.M. et LIN C., Ann. N.Y. Acad. Sci., 144: 49 (1967)

- et INGLE J., in Biochemistry and physiology of plant growth substances, p.711 (1968) cf. Adamson et al.

- et SHANNON J.C., Plant Physiol., 39:360 (1964)

KLEIN W.H., WITHROW R.B., ELSTAD V. et PRICE L., Am. J. Bot., 44:15 (1957)

LAMPORT D.T.A., Ann. Rev. Plant Physiol., 21:235 (1970)

LESHEM Y. in The molecular and hormonal basis of plant growth substances, Pergamon Press Ltd. Oxford (1973)

LERMANN L.S., J. Mol. Biol., 3:18 (1961)

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 49:94 (1963)

LEOPOLD A.C., in Hormonal regulation in plant growth and development, p.245 (1972) cf. Andersen A.S.

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., J. Biol. Chem., 193: 265 (1951)

MACQUARRIE I.G., Canadian J. Bot., 43:29 (1965)

MARKHAM R. et SMITH J.D., Biochem. J., 49:401 (1951)

MARKO A.N. et BUTLER G.C., J. Biol. Chem., 190:165 (1951)

MASUDA Y. et KAMISAKA S., Plant Cell Physiol., 10:79 (1969)

- et TANIMOTO E., Plant Cell Physiol., 8:459 (1967)

- et WADA S., Physiol. Plant., 19:1055 (1966)

MATHYSSE A.G. et PHILLIPS C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:897 (1969)

MONDAL H., MANDAL R.K. et BISWAS B.B., Nature (new biology), 240:111 (1972)

MORRÉ D.J., Plant Physiol., 40:615 (1965)

- What's news in plant physiology 4:1 (1972)

- et EISINGER W.R., in Biochemistry and physiology of plant growth substances, p.625 (1968) cf Adamson et al.

MORRIS D.A., BRIANT R.E. et THOMSON P.G., Planta, 89:178 (1969)

MUIR R.M., in Plant growth substances 1970, p.96 D.J. Carr éd. Springer-Verlag, Berlin (1972)

MÜLLER W. et CROTHER D.M., 35:251 (1968)

NOODEN L.D., Plant Physiol., 43:140 (1968)

NEUMANN J. et JONES M.E., Nature, 165:709 (1962)

NORTHCOTE D.H., in Essay in Biochemistry, Vol.5, p.89, P.N CAMPBELL et G.D. Greville, Academic Press, Londres (1969)

- Ann. Rev. Plant Physiol., 23:113 (1972)

O'BRIEN T.J., JARVIS B.C., CHERRY J.H. et HANSON J.B., Biochim. Biophys. Acta, 169:35 (1968)

OGUR M. et ROSEN G., Arch. Biochem., 25:262 (1950)

ORGEL A. et BRENNER S., J. MOL. Biol., 3:762 (1961)

OSBORNE D.J., Plant Physiol., 37:592 (1962)

PARKER M.W. HENDRICKS S.B., BORTHWICK H.A. et WENT F.W., Am. J. Bot., 36:194 (1949)

PENNY P. et GALSTON A.W., Am. J. Bot., 53:1 (1966)

PETERSON E.A., Cellulosic ion exchangers, T.S. Work et E. Work éd. North-Holland Pub. Co (1970)

PILET P.E., Les phytohormones de croissance, Masson & Cie éd. Paris (1961)

- Ann. Biol., 4:419 (1965)

- C.R. Acad. Sci. Paris, 268:930 (1969 a)

- Experientia, 25:1036 (1969 b)

PILET P.E., J. Exp. Bot., 21:446 (1970)

- Les parois cellulaires, Doin, Paris (1971)

- Experientia, 30:411 (1974)

- BRAUN R., Physiol. Plant., 20:870 (1967)

- - Physiol. Plant., 23:245 (1970)

- et CHOLLET R., C.R. Acad. Sci. Paris, 271:1675 (1970)

- GALSTON A.W., Physiol. Plant., 8:888 (1955)

- GASPAR T., Le catabolisme auxinique, Masson & Cie éd. Paris (1968)

- LANCE-NOUGAREDE A., Bull. Soc. Franç. Physiol. vég., 11:187 (1965)

PRESCOTT D.M., Exp. Cell. Res., 26:260 (1962)

- in Progress in nucleic acid research and molecular biology, Vol. 3, p.33, J.N. Davidson et W.E. Cohn éd. Academic Press, New-York (1964)

PRITCHARD N.J., BLAKE A. et PEACOCKE A.R., Nature, 212:1360 (1966)

PURVES W.K. et HILLMAN W.S., Physiol. Plant., 11:29 (1958)

RANDERATH K., Biochim. Biophys. Acta, 61:852 (1962)

RANDERATH E. et RANDERATH K., Analytical Biochem., 12:83 (1965)

RAU J. et SCHOLTISSEK C., Z. Naturforsch. Teil B, 25:292 (1970)

RAY P.M. et RUESINK A.W., Develop. Biol., 4:377 (1962)

RAYLE D.L. et CLELAND R., in Plant growth substances 1970, p.44 (1972) cf. Muir R.M.

REICH E. et GOLDBERG I.H., in Progress in nucleic acid research and molecular biology, Vol.3, p.183 (1964) cf. Prescott.

REICHARD P., Advan. Enzymol., 21:263 (1959)

RIDGE I. et OSBORNE D.J., Nature, 223:318 (1969)

ROELOFSEN P.A., Advan. Bot. Research, 2:69 (1965)

ROSS C., Plant Physiol., 40:65 (1965)

- CODDINGTON R.L., MURRAY M.G. et BLEDSOE C.S., Plant Physiol., 47:71 (1971)

ROYCHOUDHURY R. et SEN S.P., Physiol. Plant., 17:352 (1964)

SACHER J.A., Life Sciences, 11:866 (1963)

SACHS R.M., Ann. Rev. Plant Physiol., 16:73 (1965)

SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.J., J. Biol. Chem., 161:83 (1945)

SCHNEIDER W.C., J. Biol. Chem., 161:293 (1945)

SCHOLTISSEK C. et BECHT S.J., Biochim. Biophys. Acta, 123:585 (1966)

- et ROTT R., Nature, 204:39 (1964)

SEBESTA K. et ŠORM F., Coll. Czech. Chem. Communs., 24:2781 (1959)

SILBERGER J. et SKOOG F., Science, 443:44 (1953)

SMILLIE R.M. et KROTKOV G., Canadian J. Bot., 38:31 (1960)

TANIMOTO E. et MASUDA Y., Plant & Cell Physiol. 10:405 (1969)

THIMANN K.V., Am. J. Bot., 24:407 (1937)

TRUELSEN T.A., Physiol. Plant., 20:1112 (1967)

VEEN B.W., Kon. Ned. Akad. Wetensch., 73:113 (1970 a)

- ,, ,, 73:118 (1970 b)

WARING M.J., Nature, 219:1320 (1968)

WATTS J.W. et DAVIS M.A.F., Biochem. J., 100:467 (1966)

WOESE C., NAONO S., SOFFER R. et GROS F., Biochem. Biophys. Res. Comm., 11:435 (1963)

WOODSTOCK L.W; et SKOOG F., Am. J. Bot., 47:713 (1960)

- Am. J. Bot., 49:623 (1962)

YAMANA Y. et SIBATINI A., Biochim. Biophys. Acta, 41:295 (1960)

TABLE DES MATIERES

AVANTS - PROPOS 1

Tableau des abréviations 2

INTRODUCTION 3

CHAPITRE I : QUELQUES ASPECTS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

1. Généralités 4

2. Structure de la paroi 4
2.1 Microfibrilles de cellulose 6
2.2 La matrice 6
2.3 Protéines associées à la paroi 7
2.4 Modèle de paroi 8

3. Mécanisme de l'élongation cellulaire 8
3.1 Facteurs impliqués 8
3.2 Auxines et RNA 9

CHAPITRE II: MATERIEL BIOLOGIQUE, METHODES ET CRITERES DE CROISSANCE 11

1. Choix du matériel végétal 11

2. Mise en culture 13
2.1 Imbibition 13
2.2 Germination 13
2.3 Sélection 15

3. Méthodes et techniques générales 17
3.1 Délimitation de segments sur la zone d'élongation 17
3.2 Segments excisés ou "sections"..... 18
3.3 Mesure des longueurs 18
3.4 Poids frais (PF) et poids sec (PS) 19

4. Expression des résultats 20
4.1 Elongation 20
4.2 Poids frais ou poids sec 21
4.3 Teneur en eau 21

CHAPITRE III: RNA ET PROTEINES : EXTRACTION ET DOSAGE 22

1. Extractions préliminaires 23
1.1 Substances solubles à froid dans les acides 23

1.2 Substances lipidiques 24

2. Séparation différentielle du RNA et du DNA . 25
2.1 Extraction du RNA par un acide froid ... 25
2.2 Extraction du RNA par un acide chaud ... 26
2.3 Hydrolyse alcaline (SCHMIDT-THANNHAUSER) 26

3. Extraction et dosage du RNA d'épicotyle de Pois 29
3.1 Technique d'extraction 29
3.2 Spectre uv du RNA extrait 32
3.3 Dosage du RNA 38

4. Dosage des protéines 41

CHAPITRE IV: GRADIENTS DE CROISSANCE LE LONG DE L'AXE EPICOTYLAIRE 44

1. Introduction 44

2. Croissance "in situ" de la région subapicale 46
2.1 Méthodes 46
2.2 Gradients de croissance 46
2.2.1 Elongation et RNA 49
2.2.2 Evolution des autres paramètres caractérisant la croissance 53
2.2.3 Conclusion 56

3. Effet de l'AIA "in vivo" sur les segments excisés 58
3.1 Méthodes 59
3.2 Résultats 59

4. Activité AIA-oxydasique "in vitro" 61
4.1 Mesure de l'activité auxines-oxydasique. 64
4.1.1 Extraits purifiés 64
4.1.2 Technique de la mesure d'activité 65
4.2 Résultats et discussion 67

5. Traitement par l'AIA "in situ" 69
5.1 Effets caractéristiques induits par l'AIA "in situ" 69
5.2 Expériences réalisées 70
5.2.1 Plantule intacte 70
5.2.2 Plantule décapitée 71
5.3 Résultats et discussion 73
5.3.1 Plantule intacte 73
5.3.2 Plantule décapitée 75

6. Conclusion 78

CHAPITRE V : ELONGATION ET BIOSYNTHESE DU RNA: EFFETS INDUITS PAR L'ACIDE INDOLE-3-ACETIQUE 80

1. Introduction 80

2. Synthèse du RNA dans des sections d'épicotyle dont l'élongation est stimulée ou non par l'acide indole-3-acétique 84
2.1 Matériel et méthodes 84
2.1.1 Choix des sections 84
2.1.2 Cinétique de l'élongation induite par l'AIA 87
2.2 Marquage du RNA par l'uridine-2 ^{14}C et mesure de la radioactivité 87
2.2.1 Incorporation de l'uridine marquée 87
2.2.2 Détermination de la radioactivité incorporée totale ou au niveau du RNA 88

3. Résultats expérimentaux 88
3.1 Cinétique de l'élongation 88
3.2 Synthèse du RNA 90
3.2.1 Mesures spectrophotométriques 90
3.2.2 Incorporation de l'uridine dans le RNA . 91

4. Répartition de la radioactivité au niveau des nucléotides constitutifs du RNA 94
4.1 Séparation des nucléotides 94
4.1.1 Celluloses échangeurs d'anions 95
4.1.2 Préparation des CM de PEI-cellulose 99
4.1.3 Purification des extraits 102
4.1.4 Séparation des nucléotides 106
4.1.5 Mesure de la radioactivité 111
4.2 Résultats expérimentaux 111
4.2.1 Localisation de la radioactivité 111

5. Métabolisme des composés pyrimidiques 115
5.1 Synthèse normale des acides uridyliques et cytidyliques 115
5.2 Voies de synthèse dérivées 120
5.3 Efficacité des précurseurs pyrimidiques. 121

6. Conclusion 122

CHAPITRE VI: EFFETS D'INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTION SUR L'ELONGATION CELLULAIRE ET LA BIOSYNTHESE DU RNA 123

1. Introduction 123

2. Actinomycine D et proflavine:caractéristiques 125

2.1 Actinomycine D 125
2.1.1 Structure et liaison au DNA natif 125
2.1.2 Propriétés biologiques 128
2.2 Dérivés d'acridine - la proflavine 129
2.2.1 Complexe avec les acides nucléiques 129
2.2.2 Le processus d'intercalation 131

3. Matériel et méthodes 136
3.1 Elongation 136
3.1.1 Effet"in vivo" des dérivés d'acridine... 136
3.1.2 Cinétique de l'élongation en présence de proflavine ou d'actinomycine D 136
3.2 Pénétration de la proflavine dans les tissus 137
3.2.1 Traitement 137
3.2.2 Extraction de la proflavine 137
3.2.3 Dosage de la proflavine 137
3.3 Incorporation d'uridine-^{14}C et traitements..... 138
3.3.1 Marquage et traitement simultanés 138
3.3.2 Marquage préalable suivi du traitement . 138
3.4 RNA et substances acido-solubles 141
3.4.1 Extraction 141
3.4.2 Mesure de la radioactivité incorporée .. 141
3.5 Chromatographie sur CM de PEI-cellulose. 141

4. Résultats et discussion 142
4.1 Elongation 142
4.1.1 Effets de la proflavine et de l'acridine orange 142
4.1.2 Cinétique de l'élongation: influence de la proflavine et de l'actinomycine D ... 145
4.2 Incorporation d'uridine-^{14}C (RNA et fraction AS) 151
4.2.1 Marquage et traitement simultané 151
4.2.2 Marquage préalable suivi du traitement . 151

5. Conclusion 160

CONCLUSIONS GENERALES 161

BIBLIOGRAPHIE 163

TABLE DES MATIERES 169

****